



Ein molekularer Tauziehmechanismus für den Proteintransport aus Mitochondrien in Peroxisomen

Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

Dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Thorsten Stehlik
aus Alzenau

Marburg/Lahn, 2019

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von März 2014 bis August 2019 unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Michael Bölker an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachter: Prof. Dr. Uwe Maier

Tag der mündlichen Prüfung:

Teile dieser Arbeit werden/wurden in den folgenden Artikeln veröffentlicht:

Stehlik T., Kremp M., Kahnt J., Freitag J., Bölker M. (2019)

A molecular tug-of-war like mechanism for protein targeting to peroxisomes via mitochondria. *Nature Communications*. In Revision.

Stehlik T., Gal L., Harberding J., Bölker M., Schuldiner M., Zalckvar E., Freitag J. (2019)

Contacts between mitochondria and peroxisomes facilitate tug-of-war like protein sorting. In Vorbereitung.

Weitere Veröffentlichungen:

Freitag J., Stehlik T., Stiebler A.C., Bölker M. (2018)

The Obvious and the Hidden: Prediction and Function of Fungal Peroxisomal Matrix Proteins. *Subcell Biochem* **89**:139-155. Übersichtsartikel

Stiebler A.C.*, Freitag J.*, Schink K.O., Stehlik T., Tillmann B.A., Ast J., Bölker M. (2014)

Ribosomal readthrough at a short UGA stop codon context triggers dual localization of metabolic enzymes in Fungi and animals. *PLoS Genetics* **10**: e1004685

Stehlik T., Sandrock B., Ast J., Freitag J. (2014)

Fungal peroxisomes as biosynthetic organelles. *Curr Opin Microbiol* **22**:8-14. Übersichtsartikel

Freitag J., Ast J., Linne U., Stehlik T., Martorana D., Bölker M., Sandrock B. (2014)

Peroxisomes contribute to biosynthesis of extracellular glycolipids in fungi. *Mol Microbiol.* **93**:24-36.

* zu gleichen Teilen beigetragen

Vorträge

A molecular tug-of-war like mechanism for protein targeting from mitochondria to peroxisomes. Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, 2019.

The protein phosphatase Ptc5p from *S. cerevisiae* transits from mitochondria to peroxisomes. 6th Open European Peroxisome Meeting, Groningen, Niederlande, 2018.

Posterpräsentationen

Stehlik T., Kremp M., Bölker M., Freitag J. (2018)

The protein phosphatase Ptc5p from *S. cerevisiae* transits from mitochondria to peroxisomes. 6th Open European Peroxisome Meeting, Groningen, Niederlande.

Stehlik T., Bölker M., Freitag J. (2017)

The peroxisomal import machinery enables contact sites between peroxisomes and different organelles. 29th Fungal Genetics Conference, Pacific Grove, CA, U.S.A.

Stehlik T., Hensel N., Ast J., Bölker M. (2015)

Dephospho-CoA kinase localizes to peroxisomes in *U. maydis*. 11th Molecular Biology of Fungi Conference, Berlin, Deutschland. **Ausgezeichnet mit Posterpreis.**

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Ein molekularer Tauziehmechanismus für den Proteintransport aus Mitochondrien in Peroxisomen“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 18.09.2019

Thorsten Stehlik

*Laß fremde Art doch gelten,
selbst dann, wenn sie dich quält!
Gar oft ist, was wir schelten,
grad was uns selber fehlt.*

Wilhelm Kuhnert (1865 – 1926)

Zusammenfassung

Peroxisomen sind nahezu ubiquitäre eukaryotische Zellorganellen, die eine wichtige Rolle beim Abbau von Fettsäuren und des dabei gebildeten Wasserstoffperoxids spielen. Während der peroxisomalen Oxidation von Fettsäuren kooperieren Peroxisomen eng mit Mitochondrien. Das in Peroxisomen gebildete Acetyl-CoA wird in den mitochondriellen Zitronensäure-Zyklus eingespeist.

In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* enthalten die meisten peroxisomalen Matrixproteine ein carboxy-terminales Zielsteuerungs-Signal (*peroxisomales targeting signal type 1*, PTS1). Das PTS1 wird vom cytosolischen Importrezeptor Pex5 gebunden, der die Matrixproteine in gefaltetem Zustand und sogar als Oligomere in das peroxisomale Lumen importieren kann.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Protein-Phosphatase Ptc5 eine duale Lokalisierung in Mitochondrien und Peroxisomen aufweist. Die peroxisomale Lokalisierung des Proteins hängt von einem funktionellen PTS1-Signal, dem Importrezeptor Pex5 und der peroxisomalen Importmaschinerie ab. Überraschenderweise ist die proteolytische Spaltung durch den mitochondriellen Peptidase-Komplex der inneren Membran (IMP-Komplex) eine weitere Voraussetzung für den Import der Phosphatase in Peroxisomen. Bei der genaueren Charakterisierung des intrazellulären Transports von Ptc5 wurde festgestellt, dass das Protein gleichzeitig mit der mitochondriellen und der peroxisomalen Importmaschinerie interagiert, was zu einem molekularen Tauziehen zwischen den Import-Komplexen führt. Darüber hinaus kann dieser Tauziehmechanismus Kontakte zwischen Mitochondrien und Peroxisomen erzeugen. Die Fusion eines PTS1 an den C-Terminus des ER-ständigen Membranproteins Sec63 erzeugte einen künstlichen Proteinanker, der sowohl in *S. cerevisiae* als auch in dem Basidiomyceten *Ustilago maydis* Kontakte zwischen dem ER und Peroxisomen vermittelte.

Die Untersuchung der biologischen Relevanz des molekularen Tauziehens zeigte, dass der indirekte Import von Ptc5 in Peroxisomen die zellschädigende Phosphatase-Aktivität im Cytosol verhindert. Einige Daten deuten darauf hin, dass die Phosphatase in Peroxisomen die Aktivität der Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase Gpd1 durch Dephosphorylierung reguliert. Molekulares Tauziehen zwischen zwei Import-Komplexen stellt einen neuartigen Mechanismus zur Verteilung von Proteinen zwischen zwei Organellen dar. Der Mechanismus kann Kontakte zwischen Organellen herstellen und dient womöglich ebenfalls deren Kommunikation.

Summary

Peroxisomes are near-ubiquitous eukaryotic organelles with a prominent function in the breakdown of fatty acids and hydrogen peroxide. Peroxisomal β -oxidation is characterized by a close metabolic connection between peroxisomes and mitochondria. Peroxisomal acetyl-CoA is transported to mitochondria where it enters the tricarboxylic acid cycle.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* almost all peroxisomal matrix proteins contain a peroxisomal targeting signal type 1 (PTS1) at their extreme C-terminus. This signal is recognized by the cytosolic receptor Pex5, which can translocate matrix proteins across the peroxisomal membrane in a fully folded state and even as oligomers.

In this work the protein phosphatase Ptc5 was shown to display a dual localization to mitochondria and peroxisomes. Peroxisomal localization of the phosphatase was dependent on a functional PTS1, the import receptor Pex5 and an intact peroxisomal import machinery. Surprisingly, processing by the mitochondrial inner membrane peptidase (IMP) complex was another prerequisite for the peroxisomal localization of Ptc5. More detailed analysis revealed that sorting of Ptc5 involves simultaneous interaction with the import machineries of peroxisomes and mitochondria resulting in a molecular tug-of-war like mechanism. This can also establish contacts between mitochondria and peroxisomes. Fusion of a PTS1 to the C-terminus of the ER-resident membrane protein Sec63 created a synthetic tether generating contacts between the ER and peroxisomes. Analysis of the biological relevance of tug-of-war like protein sorting revealed that indirect import of Ptc5 in peroxisomes prevents deleterious phosphatase activity in the cytosol. Additional data indicate that intraperoxisomal Ptc5 dephosphorylates glycerol-3-phosphate dehydrogenase Gpd1 to regulate its activity.

Molecular tug-of-war between import machineries of two compartments represents a novel protein sorting mechanism. Furthermore, this mechanism enables organelle contacts and might facilitate interorganellar communication.

Abkürzungsverzeichnis

AAA-ATPase	„ATPase associated with diverse cellular activities"	min	Minute(n)
Abb.	Abbildung	N-Terminus	Aminotermius
ADP	Adenosindiphosphat	NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
AMP	Adenosinmonophosphat	NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Amp	Ampicillin	Nat	Nourseothricin
ATP	Adenosintriphosphat	Nos	Nopalin Synthase
bp	Basenpaare	OD600	optische Dichte bei 600 nm
bzw.	beziehungsweise	ORF	„open reading frame"
C	"Carbon"	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
C-terminal	carboxyterminal	PCR	„polymerase chain reaction"
C-Terminus	Carboxyterminus	Phleo	Phleomycin
Cbx	Carboxin	PMP	„peroxisomal membrane protein"
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein	PTS	„peroxisomal targeting signal"
CoA	Coenzym A	R	Resistenz
DMSO	Dimethylsulfoxid	RING	„really interesting new gene"
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum	SC	„Synthetic Complete"
Gent	Geneticin (G418)	SDS	„sodium dodecyl sulfate"
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	SH3	SRC Homology 3
U	Unit	Tab.	Tabelle
H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser	TMD	Transmembrandomäne
HIS	Histidin	TPR	„tetratricopeptide repeat"
Hyg	Hygromycin	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ip	„iron-sulfur-protein"	Upm	Umdrehungen pro Minute
kb	Kilobasenpaar(e)	WT	Wildtyp
kD	Kilodalton	YFP	„yellow fluorescent protein"
mCherry	„monomeric Cherry"	z.B.	zum Beispiel
		Δ	Deletion

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Peroxisomen: Aufbau und Funktion.....	1
1.1.1 Der peroxisomale Proteinimport und die Biogenese von Peroxisomen	3
1.1.2 Duale Lokalisierung peroxisomaler Proteine	7
1.2 Mitochondrien: Eine Übersicht	8
1.2.1 Imp-vermittelter Proteinimport in den Intermembranraum	12
1.3 Proteinphosphorylierung	13
1.3.1 Die Proteinphosphatase Ptc5p von <i>S. cerevisiae</i>	14
1.4 Fragestellung	14
2 Ergebnisse	16
2.1 Identifizierung von Membranproteinen mit PTS1 in <i>U. maydis</i>.....	16
2.2 Ptc5 ist in Pilzen konserviert.....	17
2.3 Untersuchung der Proteinphosphatase Ptc5 in <i>S. cerevisiae</i>.....	19
2.3.1 Ptc5 weist eine duale Lokalisierung in Mitochondrien und Peroxisomen auf.....	19
2.3.2 Ptc5p wird über Mitochondrien indirekt in Peroxisomen transportiert	22
2.3.3 Die Deletion der Imp1-Spaltstelle verhindert die peroxisomale Lokalisierung von Ptc5	25
2.3.4 Die duale Lokalisierung von Ptc5 basiert auf einem molekularen Tauziehen.....	26
2.3.5 Ein synthetisches Membranprotein mit PTS1 erzeugt Kontakte zwischen dem ER und ... Peroxisomen	29
2.3.6 Ptc5 dephosphoryliert die peroxisomale Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase Gpd1	31
2.3.7 Der indirekte Import von Ptc5 in Peroxisomen verhindert toxische Aktivität im Cytosol..	31
2.3.8 Untersuchung weiterer mitochondrieller Proteine mit PTS1	33
2.4 Untersuchung der Proteinphosphatase Ptc5 in <i>U. maydis</i>.....	37
2.4.1 UmPtc5 erzeugt Kontakte zwischen Mitochondrien und Peroxisomen	37
2.4.2 Ein synthetischer Protein-Anker erzeugt PTS1-vermittelte Kontakte zwischen dem ER ... und Peroxisomen	40
3 Diskussion	43

3.1	Die biologische Funktion von Ptc5	43
3.2	Eine neue Membrankontaktstelle zwischen Peroxisomen und Mitochondrien durch ... molekulares Tauziehen?	44
3.3	Die Translokation von Ptc5 in Mitochondrien und Peroxisomen	48
4	Material und Methoden	50
4.1	Materialien mit Bezugsquellen	50
4.1.1	Chemikalien.....	50
4.1.2	Antikörper und Enzyme.....	50
4.1.3	Puffer und Lösungen	50
4.1.4	Kits	51
4.1.5	Geräte	51
4.1.6	Sonstige Materialien.....	51
4.2	Kultivierung von Mikroorganismen.....	51
4.2.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	52
4.2.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	52
4.2.3	Kultivierung von <i>U. maydis</i>	54
4.2.4	Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Kulturen	54
4.3	Stämme, Plasmide und Oligonukleotide	55
4.3.1	<i>E. coli</i> Stämme.....	55
4.3.2	<i>S. cerevisiae</i> Stämme.....	55
4.3.3	<i>U. maydis</i> Stämme	59
4.3.4	Plasmide	61
4.4	Mikrobiologische Methoden	68
4.4.1	Transformation von <i>E. coli</i>	68
4.4.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	69
4.4.3	Transformation von <i>U. maydis</i>	70
4.4.4	Wachstumstests von <i>S. cerevisiae</i> auf Festmedium.....	71
4.5	Genetische Methoden.....	71
4.5.1	Deletion von Genen oder Genfragmenten mittels homologer Rekombination	71
4.5.2	Integration von Konstrukten in den <i>ip</i> -Locus von <i>U. maydis</i>	71
4.6	Molekularbiologische Methoden	72
4.6.1	Restriktion und Dephosphorylierung von DNA	72
4.6.2	Ligation von DNA	72
4.6.3	Gibson Assembly.....	73
4.6.4	Sequenzierung von DNA.....	73
4.6.5	Agarosegel-Elektrophorese	73
4.6.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	73

4.6.7	Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	74
4.6.8	Isolierung von genomischer DNA aus <i>U. maydis</i>	74
4.6.9	Transfer und Nachweis von DNA auf Membranen (Southern Blot)	75
4.7	Biochemische Methoden	76
4.7.1	Isolierung von denaturierten Proteinen aus <i>U. maydis</i>	76
4.7.2	Isolierung nativer Proteine aus <i>U. maydis</i>	77
4.7.3	Isolierung denaturierter Proteine aus <i>S. cerevisiae</i>	77
4.7.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	77
4.7.5	Elektrophorese von Proteinen.....	78
4.7.6	Transfer und Nachweis von Proteinen (Western Blot).....	79
4.7.7	Subzelluläre Fraktionierung	80
4.7.8	Immunpräzipitation	81
4.7.9	Silberfärbung von Proteinen.....	82
4.7.10	Massenspektrometrie.....	82
4.7.11	Immunfluoreszenz.....	83
4.8	Mikroskopie	83
4.8.1	Statistische Auswertung von Mikroskopiebildern.....	84
4.9	Bioinformatik	86
4.9.1	Identifikation von PTS1 Signalen durch reguläre Ausdrücke	86
5	Literatur	86

1 Einleitung

1.1 Peroxisomen: Aufbau und Funktion

Eukaryotische Zellen weisen eine komplexe intrazelluläre Gliederung in membranumschlossene Reaktionsräume auf, die als Organellen bezeichnet werden. Zellorganellen üben spezialisierte Aufgaben aus: im Endoplasmatischen Retikulum (ER) werden Proteine für die Zellperipherie gefaltet und verpackt, während in Mitochondrien die aerobe Energiegewinnung stattfindet (Whalley *et al*, 2018). Peroxisomen gehören ebenfalls zu den phylogenetisch hoch konservierten Zellorganellen (de Duve, 1969). Sie sind von einer einfachen Membran umgeben, in der Regel sphärisch und weisen einen Durchmesser von 0,1 - 1 µm auf. Ihre Anzahl, Größe und Proteinzusammensetzung variiert je nach Organismus, Zelltyp und Umweltbedingung (Islinger *et al*, 2018). Nach der ersten Beschreibung von Peroxisomen bei einer ultrastrukturellen Studie von Zellen aus Mäusenieren wurden sie zunächst als *microbodies* bezeichnet (Rhodin, 1954). Der Begriff "Peroxisom" wurde in den sechziger Jahren durch den belgischen Biochemiker Christian de Duve und seinen Mitarbeiter geprägt, nachdem sie eine Vesikel-Fraktion isoliert hatten, welche in der Lage war, Wasserstoffperoxid zu produzieren und abzubauen (de Duve & Baudhuin, 1966). Diese Eigenschaften sind einerseits auf das während dem Abbau von Fettsäuren freigesetzte H₂O₂ und andererseits auf die Disproportionierung von H₂O₂ durch das peroxisomale Enzym Katalase zurückzuführen (Poirier *et al*, 2006).

Neben dem oxidativen Abbau von Fettsäuren sind Peroxisomen an vielen weiteren zellulären Prozessen beteiligt. In einigen Organismen enthalten Peroxisomen Enzyme des Purin-Katabolismus, beispielsweise Urat-Oxidase. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Urat zu Allantoin und führt ebenfalls zur Produktion von Wasserstoffperoxid (Islinger *et al*, 2010). In Leberzellen der Ratte findet die Biosynthese von Gallensäuren in Peroxisomen statt (Krisans *et al*, 1985; Ferdinandusse *et al*, 2009). In Menschen spielen Peroxisomen beispielsweise eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort gegen bestimmte Viren (Dixit *et al*, 2010). Die physiologische Relevanz von Peroxisomen manifestiert sich auch in Form menschlicher Erbkrankheiten wie beispielsweise dem tödlich verlaufenden „Zellweger Syndrom“. Diese Krankheit konnte mit der Abwesenheit funktioneller Peroxisomen und dem Aktivitätsverlust bestimmter peroxisomaler Enzyme in Verbindung gebracht werden (Wanders & Waterham,

2006). Im Gewebe von Zellweger-Patienten akkumulieren sehr lange Fettsäuren und die Synthese des Etherlipids Plasmalogen ist stark reduziert (Poulos *et al*, 1986; Heymans *et al*, 1983). Peroxisomen übernehmen darüber hinaus eine wichtige Funktion im menschlichen Gehör. Das durch Schallexposition in bestimmten Zellen der Cochlea vermehrt gebildete Wasserstoffperoxid induziert die Proliferation von Peroxisomen, um eine Schädigung des Gewebes durch reaktive Sauerstoffspezies zu verhindern. Mutationen im *PJVK* Gen, dessen Genprodukt Pejvakin die Proliferation der Peroxisomen induziert, führen häufig zum Hörverlust der betroffenen Patienten (Delmaghani *et al*, 2015).

In Pflanzen und Pilzen enthalten Peroxisomen mehrere Enzyme des Glyoxylat-Zyklus, der für das Wachstum auf Fettsäuren und C2-Körpern als alleinige Kohlenstoffquellen nötig ist (Kunze *et al*, 2006). In photosynthetisch aktivem Gewebe sind Peroxisomen zudem an der Photorespiration beteiligt, einem oxidativen C2-Zyklus für den Abbau des toxischen Nebenprodukts 2-Phosphoglycolat (Tolbert *et al*, 1968).

In einzelligen und filamentösen Pilzen sind Peroxisomen noch an vielen weiteren Reaktionen des Primär- und Sekundärstoffwechsels beteiligt (van der Klei & Veenhuis, 2006a; Stehlik *et al*, 2014). In methylotrophen Hefen wie *Hansenula polymorpha* enthalten Peroxisomen das für die Metabolisierung von Methanol notwendige Enzym Alkohol-Oxidase (van der Klei *et al*, 2006). In Pilzen und auch in Pflanzen findet die Biosynthese des essentiellen Kofaktors Biotin teilweise in Peroxisomen statt (Tanabe *et al*, 2011; Magliano *et al*, 2011). In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt der letzte Schritt der Lysin-Biosynthese in Peroxisomen (Breitling *et al*, 2002; Yofe *et al*, 2016).

Beispiele für die Beteiligung von Peroxisomen am Sekundärmetabolismus sind die Synthese des β -Lactam Antibiotikums Penicillin in den Ascomyceten *Penicillium chrysogenum* und *Aspergillus nidulans* (Müller *et al*, 1991; Spröte *et al*, 2009) sowie die Biosynthese von Glycolipiden in dem Basidiomycet *Ustilago maydis* (Freitag *et al*, 2014). Einige filamentöse Schlauchpilze (Ascomycota) besitzen neben den typischen Peroxisomen eine hochspezialisierte Gattung dieser Organellen. Sie werden als *Woronin bodies* bezeichnet und dienen dem Verschluss von Septenporen, um das vollständige Auslaufen des Cytoplasmas infolge einer Verletzung der Hyphen zu verhindern (Michail Woronin, 1864; Collinge & Markham, 1985; Jedd & Chua, 2000).

Der evolutionäre Ursprung von Peroxisomen war lange Zeit unklar. Die nahezu ubiquitäre Verbreitung in Stellvertretern aller großen eukaryotischen Gruppen spricht für eine sehr frühe Entstehung dieser Zellorganellen (de Duve, 1969). Die Frage, ob Peroxisomen endosymbiontischen Ursprungs sind oder als Teil des zellulären Endomembran-Systems

existieren, wurde lange diskutiert (Tabak *et al*, 2006). Die Beobachtung, dass Peroxisomen im Gegensatz zu Mitochondrien und Chloroplasten kein eigenes Genom besitzen und von nur einer Membran umgeben sind, spricht gegen eine endosymbiontische Herkunft. Darüber hinaus werden alle löslichen Proteine durch einen komplexen Proteinapparat in das peroxisomale Lumen transloziert, der starke Ähnlichkeit zum ERAD(*endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*)-System des ER aufweist (Gabaldón *et al*, 2006; Schlüter *et al*, 2006). Andererseits können sich Peroxisomen, ähnlich wie Mitochondrien und Chloroplasten, durch Teilung vermehren und sie werden bei der Zellteilung an die Tochterzelle vererbt (Hoepfner *et al*, 2001; Fagarasanu *et al*, 2006). Mitochondrien und Peroxisomen teilen sich zudem Schlüsselkomponenten ihrer Teilungsmaschinerie (Schrader *et al*, 2012). Im Gegensatz zu autonomen Organellen wie Mitochondrien können Peroxisomen jedoch auch *de novo* gebildet werden (Hohfeld *et al*, 1991). Neuere Arbeiten deuten darauf hin, dass sich Peroxisomen in *S. cerevisiae* vom ER ableiten (Tabak *et al*, 2008). Reife Peroxisomen entstehen möglicherweise durch die Fusion zweier unterschiedlicher Vesikelpopulationen des ER (Van Der Zand *et al*, 2012). Eine kürzlich erschienene Arbeit zeigt, dass in Säugetieren neben dem ER auch Mitochondrien an der Biogenese von Peroxisomen beteiligt sind (Sugiura *et al*, 2017). Peroxisomen nehmen daher eine einzigartige Stellung unter den Zellorganellen ein, da sie ihre Membran und einige Proteine über das Endomembran-System und über Mitochondrien beziehen, sich aber andererseits auch durch Teilung vermehren können und ihre Proteine posttranslational importieren (de Duve, 2007).

1.1.1 Der peroxisomale Proteinimport und die Biogenese von Peroxisomen

Im Gegensatz zu Mitochondrien und Chloroplasten besitzen Peroxisomen weder ein Genom noch einen Translationsapparat (Leighton *et al*, 1968). Sämtliche Matrixproteine sind daher im Genom kodiert und werden nach der Synthese an freien Ribosomen in das peroxisomale Lumen transportiert. Im Gegensatz zur Translokation von Proteinen in Mitochondrien oder das ER können peroxisomale Proteine in vollständig gefaltetem Zustand, Kofaktor-gebunden und sogar als Oligomere importiert werden (McNew & Goodman, 1994; Walton *et al*, 1995; Glover *et al*, 1994). Der Import der neu synthetisierten Matrixproteine wird von zwei cytosolischen Rezeptoren durchgeführt, welche ihre jeweiligen Cargos durch zwei konservierte Zielsteuerungssequenzen erkennen.

Der überwiegende Teil der peroxisomalen Matrixproteine weist eine kleine Zielsteuerungssequenz am C-Terminus auf, die als PTS1 (*peroxisomal targeting signal 1*)

bezeichnet wird (Gould *et al*, 1990; Brocard & Hartig, 2006). Anhand der Charakterisierung von Punktmutanten des lichterzeugenden Enzyms Luciferase wurde das Tripeptid Ser-Lys-Leu als prototypische Sequenz ermittelt. Dieses Motiv ist hinreichend für die Translokation von Reporter-Proteinen in das peroxisomale Lumen (Gould *et al*, 1989; Keller *et al*, 1987). Später wurden weitere funktionelle Permutationen mit der Konsensus-Sequenz (S/A/P)-(R/K)-(L/M/I) beschrieben und man erkannte, dass die Zusammensetzung der letzten zwölf Aminosäuren die Importeffizienz des PTS1 bestimmt (Brocard & Hartig, 2006).

Das zweite peroxisomale Zielsteuerungs-Signal mit dem Konsensus (R/K)-(L/V/I)-X₅-(H/Q)-(L/A) befindet sich in der Nähe des N-Terminus und wird als PTS2 bezeichnet (Lazarow, 2006). In Pilzen sind Proteine mit PTS2 jedoch selten – in der Bäckerhefe wurden bisher nur vier Proteine mit diesem Motiv entdeckt – und in einigen Organismen fehlen sie komplett (Gonzalez *et al*, 2011; Motley *et al*, 2000; Faust *et al*, 2012).

Einige Matrixproteine werden zudem unabhängig von beiden Zielsteuerungs-Signalen in Peroxisomen importiert (van der Klei & Veenhuis, 2006b). Sie werden entweder durch die Interaktion mit anderen PTS-haltigen Proteinen (*piggy-back* Import) oder durch eine untypische Interaktion mit dem N-Terminus des PTS1-Rezeptors Pex5 in das peroxisomale Lumen transportiert (Rymer *et al*, 2018; Anderson *et al*, 2003; Islinger *et al*, 2009).

In den letzten Jahrzehnten wurden durch genetische Studien an *S. cerevisiae* und weiteren Hefepilzen über dreißig Mutanten isoliert und charakterisiert, die keine funktionellen Peroxisomen mehr bilden können. Für die Isolation nutzte man die Tatsache, dass Pilze eine intakte peroxisomale β -Oxidation benötigen, um Ölsäure - eine einfach ungesättigte, langkettige Fettsäure - als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen zu können (Erdmann *et al*, 1989; Cregg *et al*, 1990; Liu *et al*, 1992). Mutanten ohne funktionelle Peroxisomen werden einheitlich als *pex* Mutanten und die entsprechenden Proteine als Peroxine bezeichnet (Distel *et al*, 1996). Die Untersuchung dieser Mutanten trug entscheidend zum Verständnis des Transportsystems von peroxisomalen Matrixproteinen bei.

Der Import von Proteinen mit PTS1 beginnt mit der Erkennung und Bindung des Cargos durch den überwiegend cytosolischen Rezeptor Pex5. Die Interaktion findet dabei zwischen der C-terminalen TPR (*tetratricopeptide-repeats*) -Domäne des Rezeptors und dem PTS1-Motiv statt (siehe Abbildung 1). Anschließend wird der Rezeptor-Cargo-Komplex durch die Affinität von Pex5 zu dem Docking-Komplex an die peroxisomale Membran rekrutiert (Terlecky *et al*, 1995; Brocard *et al*, 1994; Gatto *et al*, 2000). Der membranständige Docking-Komplex setzt sich aus den peroxisomalen Membranproteinen (PMP) Pex13 und Pex14 sowie dem peripheren Membranprotein Pex17 zusammen (Erdmann & Blobel, 1996; Gould *et al*, 1996; Albertini *et*

al, 1997; Huhse *et al*, 1998). Durch die Assoziierung der RING(*really interesting new gene*)-Finger Peroxine Pex2, Pex10 und Pex12 mit dem Rezeptor-Cargo-Komplex und dem Docking-Komplex entsteht in *S. cerevisiae* ein peroxisomales Importomer. Nach einer verbreiteten Modellvorstellung wird der Rezeptor zusammen mit dem Cargo in die Membran inseriert, was zur Ausbildung einer transienten Pore führt (Rucktäschel *et al*, 2011; Meinecke *et al*, 2010).

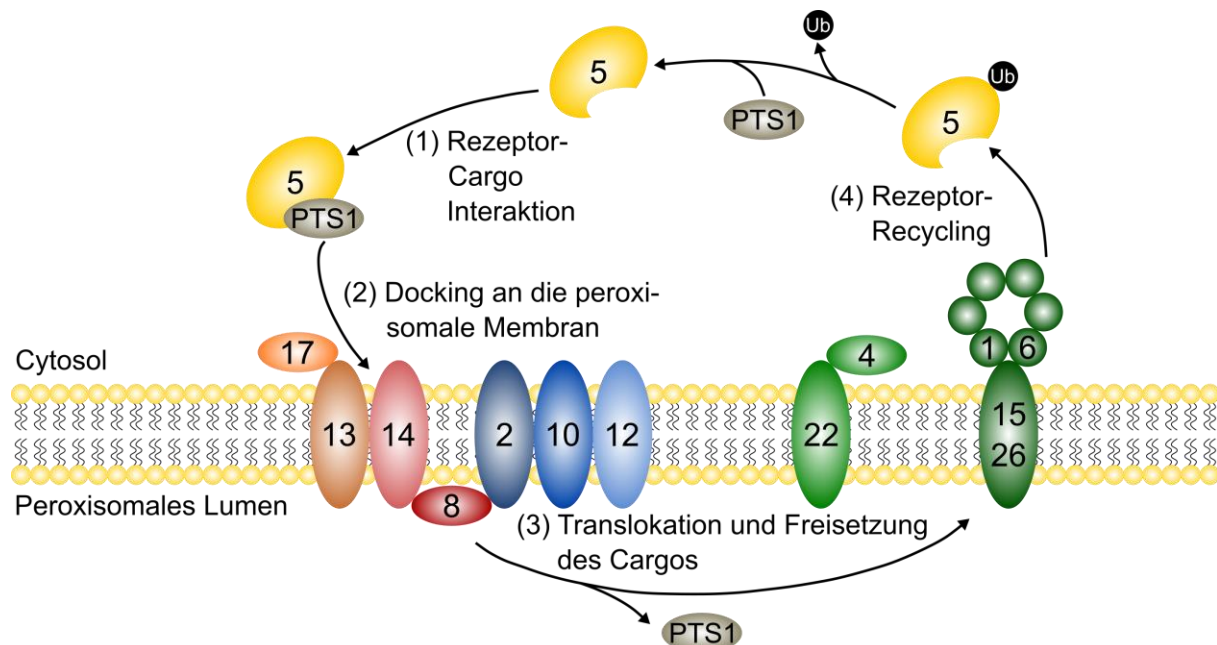


Abbildung 1: PTS1-abhängiger Proteinimport in das peroxisomale Lumen. (1) Der cytosolische Importrezeptor Pex5 erkennt und bindet das PTS1 des Cargo. (2) Der Rezeptor-Cargo-Komplex interagiert mit dem membranständigen Docking-Komplex (Pex13, Pex14, Pex17) und bildet eine transiente Pore aus. (3) Durch die Interaktion mit dem Docking- und RING-Komplex (Pex2, Pex10, Pex12) wird der Cargo in das peroxisomale Lumen freigesetzt. (4) Pex5 wird anschließend durch Pex4, Pex10 und Pex12 mono-ubiquitiniert (Ub) und mit Hilfe des Recycling-Komplexes (Pex1, Pex6, Pex15 in *S. cerevisiae*, Pex26 in Säugern) zurück ins Cytosol transportiert. Nach der Deubiquitinierung steht der Rezeptor für den Import des nächsten Cargos zur Verfügung.

Einige Daten aus menschlichen Zellen darauf hin, das Pex5 vollständig in das peroxisomale Lumen überführt wird (Dammai & Subramani, 2001). In Pilzen wird für die Ausbildung des Importomers zusätzlich das lösliche Peroxin Pex8 benötigt, da es den Docking-Komplex mit dem RING-Komplex verbindet. Pex8 besitzt sowohl ein PTS1- als auch ein PTS2-Motiv und interagiert mit beiden Importrezeptoren (Agne *et al*, 2003). Einige Daten sprechen dafür, dass Pex8 an der Freisetzung des Cargos von Pex5 beteiligt ist (Wang *et al*, 2003). Nach der Entlassung des Cargos in die peroxisomale Matrix wird der Importrezeptor zurück ins Cytosol transportiert. Die dafür benötigte Energie wird von den AAA-ATPasen Pex1 und Pex6 generiert, die in Hefe durch das Membranprotein Pex15 und in Säugern durch Membranprotein Pex26 an die Membran rekrutiert werden (Birschmann *et al*, 2003; Platta *et al*, 2005; Matsumoto *et al*, 2003). Für die Extraktion aus der Membran muss Pex5 an einem konservierten Cystein-Rest nahe des N-Terminus durch das Zusammenspiel des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms Pex4 und die Ubiquitin-Ligasen Pex2 und Pex12 mono-ubiquitiniert werden. (Koller

et al, 1999; Platta *et al*, 2007). Anschließend steht der Rezeptor für den Import des nächsten Cargos zur Verfügung.

Matrixproteine mit PTS2-Motiv werden durch den vorwiegend cytosolischen Rezeptor Pex7 erkannt und gebunden. Der Importmechanismus von Pex7 ist vermutlich sehr ähnlich zu dem bereits beschriebenen Import von PTS1-Proteinen (Rucktäschel *et al*, 2011). Im Gegensatz zu Pex5 benötigt Pex7 allerdings einen Co-Rezeptor der Pex20 Familie für den Import (Schliebs & Kunau, 2006). In *S. cerevisiae* werden die Co-Rezeptoren Pex18 und Pex21 für den PTS2-abhängigen Import benötigt (Purdue *et al*, 1998).

Peroxisomale Membranproteine können auf zwei verschiedenen Routen zur peroxisomalen Membran transportiert werden: Einige Membranproteine werden nach der Translation an freien Ribosomen direkt an die Membran transportiert und inseriert. Sie enthalten meist eine Pex19 Bindestelle (mPTS), die sich aus einer Kombination von basischen und hydrophoben Aminosäuren zusammensetzt. Das überwiegend cytosolische Chaperon Pex19 erkennt die Proteine durch das mPTS und stabilisiert sie (Jones *et al*, 2004; Rottensteiner *et al*, 2004). Anschließend bringt es den Cargo an die peroxisomale Membran und durch die Interaktion mit dem integralen Peroxin Pex3 wird das PMP in die peroxisomale Membran inseriert. Der Mechanismus der Biogenese peroxisomaler Membranproteine ist bisher nicht im Detail verstanden (Rucktäschel *et al*, 2011; Kim & Hettema, 2015; Mayerhofer, 2016). Manche Membranproteine werden vermutlich zunächst co-translationell in die ER-Membran inseriert und wandern von diskreten Subdomänen, die als peroxisomales ER (pER) bezeichnet werden, zu Peroxisomen. Dies konnte beispielsweise für Pex3 und Pex16 gezeigt werden (Hoepfner *et al*, 2005; Kim *et al*, 2006). Während der *de novo* Biogenese von Peroxisomen in *S. cerevisiae* und *H. polymorpha* werden möglicherweise noch viele weitere PMPs über das ER zu Peroxisomen transportiert (Otzen *et al*, 2004; Emerman *et al*, 2010). Kürzlich publizierte Daten zeigen, dass in menschlichen Fibroblasten auch Mitochondrien an der Neubildung von Peroxisomen beteiligt sind (Sugiura *et al*, 2017). Die Membranproteine Pex3 und Pex14 werden zunächst in Mitochondrien transportiert und dann als prä-peroxisomale Vesikel freigesetzt. Durch die anschließende Fusion dieser mitochondriellen Vesikel mit Pex16-positiven Vesikeln des ER entstehen import-kompetente Peroxisomen (Sugiura *et al*, 2017).

Einige Peroxine sind nicht am peroxisomalen Proteinimport beteiligt, aber übernehmen wichtige Funktionen während der peroxisomalen Biogenese. Das Peroxin Pex11 aus *S. cerevisiae* ist beispielsweise an der Teilung und Proliferation von Peroxisomen beteiligt (Marshall *et al*, 1995; Thoms & Erdmann, 2005). Die Deletion von *pex11* führt zu einer reduzierten Anzahl an Peroxisomen, die zum Teil stark vergrößert sind. Die Überexpression

des Proteins resultiert dagegen in einer erhöhten Anzahl von Peroxisomen (Marshall *et al*, 1995). Während der Proliferation von Peroxisomen nimmt zunächst ihr Volumen zu, möglicherweise durch die Fusion mit Vesikeln vom ER. Anschließend elongieren sie zu tubulären Strukturen und werden durch die Einschnürung der Membran geteilt (Motley & Hettema, 2007). In *S. cerevisiae* werden die Dynamin-ähnlichen GTPasen Dnm1 und Vps1 für die Teilung benötigt, wobei Dnm1 auch für die Teilung von Mitochondrien benötigt wird (Hoepfner *et al*, 2001; Motley & Hettema, 2007; Nagotu *et al*, 2008).

1.1.2 Duale Lokalisierung peroxisomaler Proteine

Einige peroxisomale Proteine befinden sich nicht nur in Peroxisomen, sondern lokalisieren zum Teil oder überwiegend in anderen Zellorganellen oder im Cytoplasma. In *Arabidopsis thaliana* wurde beispielsweise das Peroxin Pex16 im ER und in Peroxisomen detektiert (Karnik & Trelease, 2005). Eine ähnliche duale Verteilung wurde in *Pichia pastoris* für die Peroxine Pex30 und Pex31 beobachtet (Yan *et al*, 2007).

Manche Stoffwechselwege laufen in Peroxisomen und anderen Organellen oder dem Cytoplasma ab, da Isoformen des entsprechenden Enzyms mit unterschiedlichen Zielsteuerungssequenzen ausgestattet sind (Ast *et al*, 2013). Die Zelle nutzt für die Herstellung dieser unterschiedlichen Enzymvarianten eine Reihe von Mechanismen. Im Genom von *S. cerevisiae* sind zum Beispiel drei Gene für die NADPH-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase codiert, die jeweils ausschließlich in Mitochondrien (Idp1), Peroxisomen (Idp3) oder im Cytosol (Idp2) lokalisieren (Haselbeck & McAlister-Henn, 1993, 1991; Henke *et al*, 1998). Die peroxisomale Isoform sorgt über einen 2-Ketoglutarat-Isocitrat-Shuttle für die Regeneration des für die β -Oxidation ungesättigter Fettsäuren benötigten NADPH, da lediglich Metabolite mit einem Molekulargewicht von weniger als 400 Dalton die peroxisomale Membran ungehindert passieren können (Van Roermund *et al*, 1998; Visser *et al*, 2007).

Unterschiedliche Isoformen können auch durch transkriptionelle oder post-transkriptionelle Mechanismen von nur einem Gen abgeleitet werden. So wird die mitochondrielle und peroxisomale Variante der Carnitin-O-Acetyltransferase Cat2 in *S. cerevisiae* durch unterschiedliche Transkriptionsstarts des gleichen Gens gebildet. In *Candida albicans* wird die cytosolische und die peroxisomale Isoform der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durch alternatives Spleißen erzeugt (Strijbis *et al*, 2012).

Die Ausstattung von Polypeptiden mit unterschiedlichen Zielsteuerungssequenzen kann auch durch translationelle Mechanismen wie der Verwendung alternativer Startcodons oder das

Überlesen des Stopcodons erfolgen. In Pilzen und menschlichen Zellen entstehen beispielsweise peroxisomale Isoformen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase bzw. der Lactat-Dehydrogenase B durch das Überlesen bestimmter Stopcodon-Kontexte (Freitag *et al.*, 2012; Stiebler *et al.*, 2014).

Post-translationelle Modifikationen ermöglichen eine dynamische Veränderung der Lokalisierung einer distinkten Isoform, beispielsweise während der Adaptation an veränderte Umweltbedingungen. So wird die überwiegend cytosolische Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase Gpd1 in *S. cerevisiae* in Gegenwart von Fettsäuren verstärkt in Peroxisomen importiert, indem die Importeffizienz des PTS2-Motivs durch die Phosphorylierung benachbarter Serin-Reste gesteigert wird (Jung *et al.*, 2010). Proteine mit einem schwachen PTS1-Motiv zeigen ebenfalls häufig eine duale Lokalisierung im Cytosol und in Peroxisomen, da ein Großteil der Moleküle lange Zeit im Cytosol verweilt (Ast *et al.*, 2013).

1.2 Mitochondrien: Eine Übersicht

Mitochondrien sind wahrscheinlich vor ca. zwei Milliarden Jahren durch die Phagozytose eines Alpha-Proteobakteriums von einem Vorgänger der modernen eukaryotischen Zellen entstanden (Gray *et al.*, 1999; Lane & Martin, 2010). Wie der bakterielle Vorfahre werden Mitochondrien von zwei funktionell distinkten Membranen umschlossen. Die äußere Membran (*outer mitochondrial membrane*, OM) grenzt den Intermembranraum (*intermembrane space*, IMS) gegen die innere Membran (IM) ab, während die mitochondrielle Matrix von der IM begrenzt wird. Die OM enthält eine Reihe integraler Membranproteine, unter anderem Komponenten der mitochondriellen Importmaschinerie und porenbildende Membranproteine (Herrmann & Neupert, 2013; Lindén *et al.*, 1984). Die membranspannenden Komplexe der Atmungskette und die ATP-Synthase lokalisieren überwiegend in zahlreichen Einstülpungen der IM (Cristae). Diese führen zu einer starken Vergrößerung der Oberfläche der inneren Membran (Alberts *et al.*, 2002; Vogel *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zu Peroxisomen müssen Mitochondrien aktiv vererbt werden. In *S. cerevisiae* werden sie unmittelbar nach Beginn der Knospung durch Myosin-Motoren über Aktin-Filamente in die Tochterzelle transportiert. Die Organellen sind zudem an beiden Zellpolen verankert, um einen Teil der Mitochondrien in der Tochter- und Mutterzelle zu fixieren (Westermann, 2014).

Mitochondrien bilden häufig ein tubuläres Netzwerk, dessen Form durch regelmäßige Teilungs- und Fusionsereignisse ständigen Veränderungen unterworfen ist (Bereiter-Hahn,

1990; Bereiter-Hahn & Vöth, 1994). Beide Prozesse werden durch hochkonservierte GTPasen der Dynamin-Familie vermittelt. In Menschen, Fliegen und Würmern ist das cytosolische Dynamin Drp1 für die Teilung verantwortlich, während in *S. cerevisiae* Dnm1 benötigt wird (Labrousse *et al*, 1999; Bleazard *et al*, 1999; Smirnova *et al*, 2001). Vor einigen Jahren wurde festgestellt, dass auch das ER für die mitochondrielle Teilung benötigt wird. Es markiert die Position der Abtrennung, indem es die mitochondrielle Membran einschnürt und dadurch die Rekrutierung von Dnm1 initiiert (Friedman *et al*, 2011). Die Fusion der OM wird in Säugetieren durch die membranständigen Mitofusine Mfn1 und Mfn2 (Fzo1 in *S. cerevisiae*) vermittelt und das integrale Membranprotein Opa1 (Mgm1 in *S. cerevisiae*) bewerkstelligt die Fusion der IM (Hoppins *et al*, 2007; Hermann *et al*, 1998; Sesaki *et al*, 2003).

Die Morphologie, Verteilung und Proteinzusammensetzung von Mitochondrien unterscheidet sich je nach Zelltyp und Umweltbedingungen (Bakeeva *et al*, 1978; Mootha *et al*, 2003; Yu *et al*, 2006; Jendrach *et al*, 2008). So lokalisieren Mitochondrien beispielsweise in Nervenzellen hauptsächlich an der presynaptischen Membran, wo sie ATP für die Ausschüttung von Neurotransmittern und für die Wiederaufnahme neurosekretorischer Vesikel bereitstellen (Landau & Kwanbunbumpen, 1969).

Mitochondrien spielen eine entscheidende Rolle bei vielen biochemischen Vorgängen. Sie generieren ATP durch oxidative Phosphorylierung und sind an zahlreichen Stoffwechselwegen beteiligt. Dazu zählen unter anderen der Zitronensäurezyklus, der Harnstoffzyklus sowie die Biosynthese einiger Lipide und Aminosäuren. Auch die Biosynthese wichtiger Kofaktoren wie Häm, Biotin und Eisen-Schwefel-Zentren findet teilweise oder vollständig in Mitochondrien statt (Ajioka *et al*, 2006; Baldet *et al*, 1997; Lill, 2009). Darüber hinaus regulieren Mitochondrien gemeinsam mit dem ER und weiteren Organellen die Calcium-Homöostase und sind in höheren Eukaryoten essentiell für die Aktivierung der Apoptose (Raffaello *et al*, 2016; Jeong & Seol, 2008; Falkenberg *et al*, 2007).

Viele der genannten Prozesse, wie etwa die Lipidsynthese und die Calcium-Homöostase, bewerkstelligen Mitochondrien in Kooperation mit anderen Zellorganellen. Die Transmission von Signalen oder Molekülen findet dabei in Regionen statt, in denen sich die Organellen in enger räumlicher Nähe zueinander befinden. Diese Regionen werden häufig als Membrankontaktstellen (*membrane contact sites*, MCS) bezeichnet und durch Proteinanker (*tether*) ausgebildet und aufrechterhalten. Eine wichtige Kontaktstelle zwischen Mitochondrien und dem ER wurde in *S. cerevisiae* durch einen genetischen Screen identifiziert (Kornmann *et al*, 2009). Der essentielle ERMES(*ER-mitochondria encounter structure*)-Komplex besteht aus mindestens fünf Proteinen: Den integralen Proteinen der OM, Mdm10, Mdm34 und Gem1, dem

integralen ER-Protein Mmm1, sowie dem cytosolischen Protein Mdm12. Drei dieser Proteine besitzen eine lipid-bindende SMP(*synaptotagmin-like mitochondrial lipid-binding protein*)-Domäne und Mitochondrien aus Deletionsmutanten von Untereinheiten des ERMES-Komplex weisen eine veränderte Lipidzusammensetzung auf (Osman *et al*, 2009; Tamura *et al*, 2012; Tan *et al*, 2013). Die Geschwindigkeit des Lipidaustauschs zwischen dem ER und Mitochondrien in ERMES Mutanten ist allerdings nicht oder nur geringfügig gestört (Kornmann *et al*, 2009; Nguyen *et al*, 2012; Voss *et al*, 2012). Die Rolle des Komplexes beim nicht-vesikulären Lipidaustausch zwischen den beiden Organellen ist noch nicht vollständig geklärt. Lahiri *et al* identifizierten einige Jahre nach der Entdeckung von ERMES einen weiteren konservierten Proteinkomplex im ER (*ER membrane protein complex*, EMC). Dieser bildet durch die Interaktion mit einem integralen Protein der OM, Tom5, eine MCS zwischen Mitochondrien und dem ER aus und ist ebenfalls am Austausch von Phospholipiden beteiligt. Zellen, denen sowohl Proteine des EMC- als auch des ERMES-Komplexes fehlen, sind nicht lebensfähig. Das kann als Hinweis auf eine partielle Redundanz beider Kontaktstellen gelten (Lahiri *et al*, 2014).

In *S. cerevisiae* wurden darüber hinaus Proteinanker von Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und Vakuolen, dem kortikalen ER und Lipidtropfen identifiziert (Elbaz-Alon *et al*, 2014; Hönscher *et al*, 2014; Klecker *et al*, 2013; Lackner *et al*, 2013; Wang *et al*, 2011).

Auch die interne Struktur der Mitochondrien basiert auf Membrankontaktstellen. Bereits vor über dreißig Jahren zeigten Schleyer und Neupert durch Importstudien an isolierten Mitochondrien, dass die Translokation mitochondrieller Proteine an Kontaktstellen zwischen der äußeren und inneren Membran stattfindet (Schleyer & Neupert, 1985). Viele Komponenten dieser Kontaktstellen sowie die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen wurden inzwischen aufgeklärt (Horvath *et al*, 2015). Ein konservierter Proteinkomplex vermittelt auch die Ausbildung der Cristae und die damit einhergehenden Kontaktstellen der inneren Membran (*cristae junctions*, Hoppins *et al*, 2011).

Aufgrund ihrer endosymbiontischen Herkunft besitzen Mitochondrien ein zirkuläres Genom sowie einen eigenen Transkriptions- und Translationsapparat (Schatz, 1963; Corneo *et al*, 1966). Das Genom des Symbionten wurde im Laufe der Evolution stark reduziert und die meisten Gene gingen entweder verloren oder wurden in das Wirtsgenom transferiert (Gray *et al*, 1999). Das mitochondrielle Genom der Bäckerhefe ist 85 kb groß und liegt in zahlreichen Kopien in der Zelle vor (Hall *et al*, 1976; Sena *et al*, 1976; Conrad & Newlon, 1982; Foury *et al*, 1998). Interessanterweise kodieren alle offenen Leserahmen ausschließlich für membranständige Untereinheiten der Atmungsketten-Komplexe (Foury *et al*, 1998).

Mitochondrien besitzen mehrere Translokations-Systeme, die sowohl den Import als auch den intra-mitochondriellen Transport der Kern-codierten Proteine bewerkstelligen (Herrmann & Neupert, 2013). Genetische und biochemische Untersuchungen in *S. cerevisiae* trugen maßgeblich zur Aufklärung der molekularen Mechanismen und der daran beteiligten Proteine bei (Hoogenraad & Ryan, 2001). Die Vorgänge zwischen der Synthese eines mitochondriellen Proteins im Cytosol und dessen Import in Mitochondrien sind noch nicht genau verstanden (Hansen *et al.*, 2018). In einigen Fällen wird das naszente Polypeptid durch Chaperone gebunden, um eine verfrühte Faltung im Cytoplasma zu unterbinden (Fan & Young, 2011). Andere Daten deuten darauf hin, dass ein erheblicher Teil des mitochondriellen Proteoms co-translationell in das Organell transportiert wird (Chacinska *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2014). Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigt, dass auch ER-Proteine am mitochondriellen Proteinimport beteiligt sind (Hansen *et al.*, 2018).

Mitochondrielle Proteine werden als Vorläuferproteine translatiert und können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Fast alle Vorläufer von Matrixproteinen sowie einige Vorläufer von Proteinen des IMS und der inneren Membran tragen eine N-terminale Zielsteuerungs-Sequenz (Presequenz), die während der Translokation durch die mitochondrielle Prozessierungs-Peptidase (MPP) in der Matrix entfernt wird. Die positiv geladene Presequenz interagiert mit den mitochondriellen Importrezeptoren, welche den Vorläufer über die äußere und innere Membran leiten (Schatz & Dobberstein, 1996; Pfanner & Geissler, 2001).

Die zweite Gruppe von Preproteinen enthält verschiedene interne Lokalisierungs-Signale. Darunter finden sich alle Vorläufer von Membranproteinen der äußeren Membran sowie von einigen Proteinen des IMS und der inneren Membran (Koehler *et al.*, 1999; Pfanner & Geissler, 2001).

Die Translokase der äußeren mitochondriellen Membran (TOM-Komplex) stellt den zentralen Zugang für die meisten mitochondriellen Preproteine dar. Der TOM-Komplex besteht aus mehreren Preprotein-Rezeptoren und einer generellen Importpore. Nach der Translokation durch den TOM-Komplex können Vorläuferproteine auf drei Wegen weiter sortiert werden (Koehler *et al.*, 1999; Herrmann & Neupert, 2000; Jensen & Johnson, 2001; Pfanner & Geissler, 2001; Endo *et al.*, 2003): (1) Preproteine mit einer Presequenz werden zur Presequenz-Translokase der inneren Membran (TIM23-Komplex) transferiert. Der TIM23-Komplex bildet eine Pore in der inneren Membran und kooperiert mit dem Chaperon mtHsp70 auf der Matrixseite. mtHsp70 stellt die zentrale Komponente des Presequenz-Translokase assoziierten Motors dar, der unter ATP-Verbrauch den Transport in die mitochondrielle Matrix antreibt. (2)

Die Vorläufer vieler hydrophober Proteine der inneren Membran folgen einer anderen Importroute. Dazu gehören Chaperon-ähnliche Komponenten des IMS und die Proteininsertions-Maschinerie der inneren Membran (TIM22-Komplex). (3) Vorläufer von integralen Proteinen der äußeren Membran, wie das abundante Porin, werden durch den SAM(*sorting and assembly machinery*)-Komplex in die Membran inseriert.

1.2.1 Imp-vermittelter Proteinimport in den Intermembranraum

Proteine des Intermembranraums spielen eine wichtige Rolle in der Kommunikation mit dem Cytosol und anderen mitochondriellen Subkompartimenten. Außerdem sind sie an der Aufnahme von Metaboliten, Lipiden sowie in höheren Eukaryonten an der Regulation des programmierten Zelltods beteiligt (Jeong & Seol, 2008; Herrmann & Riemer, 2010; Aaltonen *et al*, 2016; Miyata *et al*, 2016).

Vorläufer löslicher IMS-Proteine können in zwei Gruppen unterteilt werden: (1) Die Mehrzahl aller Vorläufer enthält keine Presequenz. Diese Polypeptide werden durch den IMS-Rezeptor Mia40 erkannt und importiert. Während des Imports werden intramolekulare Disulfidbrücken in den Preproteinen gebildet, die kritisch für deren korrekte Faltung und Verbleib im IMS sind (Chacinska *et al*, 2004; Terziyska *et al*, 2005; Naoé *et al*, 2004). Die Substrate von Mia40 sind in der Regel kleine Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 7 und 25 kDa (Backes & Herrmann, 2017).

(2) Einige IMS-Vorläuferproteine enthalten ein zweiteiliges Zielsteuerungs-Signal, das aus einer mitochondriellen Presequenz und einer sich daran anschließenden hydrophoben Region (Stopp-Transfer Sequenz) besteht. Die Presequenz dirigiert den N-Terminus dieser Vorläufer zunächst in die Matrix, bis die Stopp-Transfer Sequenz auf den TIM23-Komplex trifft und die Translokation arretiert. Anschließend wird die Presequenz durch MPP abgespalten und das Preprotein wird in die innere Membran entlassen. Nach dieser ersten Prozessierung erfolgt eine zweite proteolytische Spaltung direkt hinter der Stopp-Transfer Sequenz, was zur Freisetzung des reifen Proteins in den IMS führt (Glick *et al*, 1992; Esser *et al*, 2002; Rainey *et al*, 2006; Tatsuta *et al*, 2007). Die zweite Spaltung wird unter anderem von der membranständigen Protease der inneren Membran (*inner membrane protease*, IMP) katalysiert. In *S. cerevisiae* bilden die katalytischen Komponenten Imp1p und Imp2p mit der nicht-katalytischen Komponente Som1p einen hetero-oligomeren Komplex aus. Die katalytischen Untereinheiten sind integrale Proteine der IM, deren aktive Zentren in den IMS ragen. Beide Proteine besitzen Ähnlichkeit zueinander und zu gewissen bakteriellen Signalpeptidasen, weisen aber distinkte

Substratspezifitäten auf (Nunnari *et al*, 1993; Jan *et al*, 2000). In *S. cerevisiae* wurden bisher fünf Imp1-Substrate identifiziert: NADH-Cytochrom b5 Reduktase (Mcr1), Cytochrom b2 (Cyb2), FAD-abhängige Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase (Gut2), Proteinphosphatase Typ 2C 5 (Ptc5) sowie die mitochondriell kodierte Untereinheit II der Cytochrom C Oxidase (Cox2). Das einzige bekannte Imp2p-Substrat ist das Cytochrom c1 Cyt1 (Jan *et al*, 2000; Esser *et al*, 1996; Nunnari *et al*, 1993; Vögtle *et al*, 2012; Esser *et al*, 2004). Zusätzlich zu seiner katalytischen Aktivität wird Imp2 auch für die stabile Expression von Imp1 benötigt (Nunnari *et al*, 1993).

Pulsmarkierungen von Punktmutanten von Imp1-Substraten zeigen, dass Imp1 für die Erkennung einen sauren Aminosäure-Rest an der P'₁ (die erste Aminosäure hinter der Spaltstelle) Position benötigt und hydrophobe, nicht-aromatische Aminosäure-Reste an den Positionen P₁ bzw. P₃ (die erste bzw. dritte Aminosäure vor der Spaltstelle) bevorzugt. Im Gegensatz dazu toleriert Imp2 eine Reihe unterschiedlicher Aminosäure-Substitutionen an der P'₁ Position, aber ein Alanin-Rest an P₁ ist kritisch für die Erkennung des Substrats. An der P₃ Position bevorzugt Imp2 kleine unpolare Aminosäuren (Luo *et al*, 2003, 2006).

1.3 Proteinphosphorylierung

Post-translationelle Modifikationen beeinflussen die Aktivität, subzelluläre Lokalisierung und Stabilität von Proteinen und ermöglichen der Zelle eine rasche Antwort auf externe und interne Signale, wie Wachstumsfaktoren oder DNA-Schäden. Die reversible Phosphorylierung von Proteinen stellt die häufigste Form dieser Modifikationen dar und sie reguliert diverse biologische Prozesse wie die Transkription und den Zellzyklus. Die Relevanz der Proteinphosphorylierung wird daran deutlich, dass rund 30% des Proteoms von *S. cerevisiae* durch diesen regulatorischen Prozess beeinflusst wird und 2 – 4% aller Gene eines typischen Eukaryonten für Proteinkinasen oder Phosphatasen kodieren (Ptacek *et al*, 2005; Manning *et al*, 2002).

Die Phosphorylierung wird von Proteinkinasen katalysiert, die eine Phosphatgruppe, in der Regel von ATP, kovalent auf einen Aminosäure-Rest eines Zielproteins übertragen. Proteinphosphatasen entfernen die Phosphatgruppe wieder und das Gleichgewicht zwischen Kinasen und Phosphatasen bestimmt den Phosphorylierungsgrad eines Proteins.

1.3.1 Die Proteinphosphatase Ptc5p von *S. cerevisiae*

Die Proteinphosphatase Ptc5 ist eine von sieben Proteinphosphatasen des Typs 2C (PP2C) von *S. cerevisiae* (Cheng *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2002; Ruan *et al.*, 2007). Diese Klasse von Phosphatasen findet sich sowohl in Bakterien als auch in zahlreichen Eukaryonten und ist häufig eine Komponente stress-induzierter Signaltransduktionskaskaden (Schweighofer *et al.*, 2004; Cutler *et al.*, 2010; Lammers & Lavi, 2007). PP2Cs gehören zur Gruppe der Serin-Threonin-Phosphatasen und liegen in der Regel als monomere Enzyme vor. Sie benötigen Magnesium- oder Mangan-Ionen als Kofaktoren (Ariño *et al.*, 2011).

Ptc5 wurde in mehreren Proteom-Analysen im mitochondriellen IMS gefunden (Vögtle *et al.*, 2012; Currie *et al.*, 2014; Vögtle *et al.*, 2017). Vögtle und andere zeigten durch Importstudien mit radioaktiv markierten Preproteinen, dass Ptc5 durch den Imp-Weg in den IMS transportiert wird. Imp1 wird für die Prozessierung von Ptc5 Vorläufer-Molekülen *in vitro* benötigt und in einer *imp1* Deletionsmutante wird kein reifes Polypeptid mehr gebildet (Vögtle *et al.*, 2012).

Vor ungefähr 10 Jahren wurden Daten publiziert, die nahe legen, dass Ptc5 gemeinsam mit einer weiteren Phosphatase die Aktivität der E1-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase, Pda1, reguliert (Krause-Buchholz *et al.*, 2006; Gey *et al.*, 2008). Nach der Publikation von Vögtle *et al.* von 2012 merkten andere Autoren jedoch an, dass die subzelluläre Lokalisierung von Ptc5 im IMS gegen eine solche Funktion sprechen, da sich die Pyruvat-Dehydrogenase in der mitochondriellen Matrix befindet (Nuebel *et al.*, 2016). Vor kurzem wurde durch biochemische Analysen verbunden mit der Massenspektrometrie von Phosphopeptiden das Protein Ptc6 als Phosphatase von Pda1 identifiziert (Guo *et al.*, 2017). Die zelluläre Funktion von Ptc5 ist somit weiter ungeklärt.

1.4 Fragestellung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Beobachtung, dass einige Proteine mit PTS1 Membrandomänen aufweisen. Diese Beobachtung war überraschend, da bis zu diesem Zeitpunkt ausschließlich lösliche Proteine als Substrate für den peroxisomalen Importrezeptor Pex5 beschrieben waren. Daher stellte sich die Frage, ob membrangebundene Proteine tatsächlich ein Substrat von Pex5 darstellen können und welche biologische Funktion sie erfüllen. Eine Arbeitshypothese war, dass solche Proteine möglicherweise Kontaktstellen zwischen Peroxisomen und demjenigen Zellorganell erzeugen, in dessen Membran sie verankert sind.

Zunächst sollten membrangebundene Proteine mit PTS1-Motiv in dem Basidiomyceten *Ustilago maydis* durch eine bioinformatische Analyse systematisch identifiziert werden. Robuste Kandidaten sollten genetisch, zellbiologisch und biochemisch charakterisiert werden. Die subzelluläre Lokalisierung der Proteine sollte durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen ermittelt werden. Zudem sollte überprüft werden, ob die Fusionsproteine in Abhängigkeit von Pex5 und einem funktionellen PTS1-Motiv räumliche Nähe zwischen Peroxisomen und dem Zellorganell, in dessen Membran sie verankert sind, erzeugen. Des Weiteren sollte die biologische Funktion der Kandidaten durch eine phänotypische Analyse der entsprechenden Deletionsmutanten bestimmt werden. Im Falle der experimentellen Bestätigung der Arbeitshypothese sollte durch das Anfügen eines PTS1 an ein charakterisiertes Membranprotein ein synthetischer Proteinanker generiert werden.

2 Ergebnisse

2.1 Identifizierung von Membranproteinen mit PTS1 in *U. maydis*

Für die Identifizierung von Membranproteinen mit PTS1 wurden zunächst alle *U. maydis* Proteine durch Verwendung regulärer Ausdrücke auf die Anwesenheit eines PTS1 hin untersucht. Reguläre Ausdrücke können mit geeigneten Texteditoren wie Notepad++ als Filterkriterien in der Textsuche verwendet werden, indem der Text mit dem Muster des regulären Ausdrucks abgeglichen wird. Als Muster wurde die Konsensus-Sequenz des PTS1-Motivs verwendet (siehe 4.9.1). Die Treffer wurden daraufhin mit drei unterschiedlichen Algorithmen (TMHMM 2.0, Phobius, Topcons) auf die Anwesenheit von Transmembrandomänen untersucht (Krogh *et al*, 2001; Käll *et al*, 2004; Tsirigos *et al*, 2015). Anschließend wurden die Kandidaten manuell mit der Pedant Datenbank (nicht mehr verfügbar seit 2019) abgeglichen, da der für die initiale Suche verwendete Datensatz des Broad Institute teilweise auf einer veralteten Annotation beruhte. Insgesamt wurden 13 Proteine mit einem PTS1-Motiv und mindestens einer Transmembrandomäne identifiziert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Membranproteine mit PTS1

Acc. Nr.	Beschreibung	Länge (AS)	TMD(s)	PTS1 kons.?	TMD kons.?
UM00222	related to mono-carboxylate transporter	544	12	Nein	Ja
UM11651	related to Betaine lipid synthase	944	1	Nein	Nein
UM01286	related to PTC5 - putative 2C protein phosphatase	765	1	Ja	Ja
UM01731	uncharacterized protein	597	6	Nein	Ja
UM10825	related to 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	270	1	Nein	Nein
UM03476	uncharacterized protein	393	1	Nein	Nein
UM04056	probable SNQ2 - ABC transporter involved in multidrug resistance	1606	14	Nein	Ja
UM04479	related to 4-coumarate--CoA ligase	564	1	Ja	Nein
UM05122	related to carboxylic acid transport protein JEN1	513	10	Nein	Ja
UM05456	uncharacterized protein	463	6	Nein	Nein

Acc. Nr.	Beschreibung	Länge (AS)	TMD(s)	PTS1	TMD
				kons.?	kons.?
UM05933	probable Sulfate permease	897	11	Nein	Ja
UM06200	related to Peroxisomal assembly protein PEX3	585	1	Nein	Ja

Acc. Nr.: *Accession number*, AS: Aminosäure, kons.: konserviert.

Der reguläre Ausdruck für die Suche von PTS1-Motiven beinhaltete lediglich die letzten drei Aminosäuren der jeweiligen Proteine. Das führt zu einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Treffer, da funktionelle Tripeptide auch durch spontane Mutationen entstehen können (Neuberger *et al.*, 2004). Auch die Vorhersage von Transmembrandomänen ist fehlerhaft, insbesondere dann, wenn für das untersuchte Polypeptid nur eine einzige TMD vorhergesagt wird. Zur Unterscheidung legitimer und falsch-positiver Treffer wurde durch Sequenzvergleiche mit den Modellpilzen *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Cryptococcus neoformans* und *Saccharomyces cerevisiae* überprüft, inwiefern das PTS1-Motiv (Spalte „PTS1 kons.“) und die Transmembrandomänen (Spalte „TMD kons.“) eines Kandidaten konserviert sind. Funktionelle PTS1-Motive zeichnen sich häufig durch die Variabilität der letzten drei Aminosäuren in verschiedenen Protein-Homologen aus.

Nur Um01286, ein Homolog der Proteinphosphatase Ptc5 von *S. cerevisiae*, und Um04479, eine 4-Hydroxymethylsäure-CoA-Ligase, wiesen die für funktionelle PTS1 Signale charakteristische Varianz der drei endständigen Aminosäuren auf. Allerdings ist nur die TMD von Um01286 (von nun an als UmPtc5 bezeichnet) phylogenetisch konserviert, was dieses Protein zum einzigen robusten Treffer machte.

2.2 Ptc5 ist in Pilzen konserviert

Die Proteinsequenz von UmPtc5 weist eine Ähnlichkeit von 47% zu der Proteinphosphatase Ptc5 (PPP1, YOR090C) von *S. cerevisiae* auf. UmPtc5 enthält jedoch einen um ca. 150 Aminosäuren erweiterten N-Terminus. Beide Polypeptide besitzen eine sehr ähnliche Domänenstruktur, die in Abbildung 2A am Beispiel von Ptc5 von *S. cerevisiae* dargestellt ist. Am N-Terminus befindet sich eine mitochondrielle Presequenz (MTS) dicht gefolgt von einer Transmembrandomäne. Die katalytische Phosphatase-Domäne vom Typ 2C überspannt den Großteil des Proteins. Am C-Terminus befindet sich das PTS1-Motiv. Aufgrund der Ähnlichkeit der beiden Proteine in Bezug auf ihren Aufbau sowie ihre Primärsequenz sind sie vermutlich homolog zueinander. Sequenzvergleiche mit BLASTp zeigen, dass Ptc5 mit der

beschriebenen Domänenstruktur in nahezu allen untersuchten Pilzen konserviert ist (Abbildung 2B).

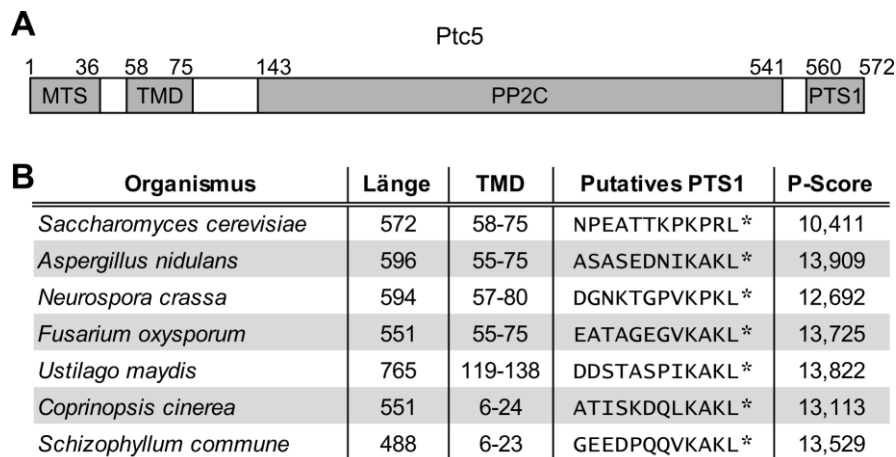


Abbildung 2: Proteinarchitektur von Ptc5 und dessen evolutionäre Konservierung in Pilzen. A. Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Ptc5 aus *S. cerevisiae*. MTS: „mitochondrial targeting signal“, TMD: Transmembrandomäne, PP2C: Protein-Phosphatase Typ 2C. **B.** Konservierung der TMD und des PTS1 von Ptc5 in pilzlichen Modellorganismen. Die P-Score ist ein Ausdruck für die Wahrscheinlichkeit, dass der entsprechende C-Terminus ein funktionelles PTS1 enthält.

Eine bioinformatische Untersuchung mit dem Programm PTS1-Predictor prognostizierte funktionelle PTS1-Signale in allen gezeigten C-Termini. Das Programm beschreibt die Wahrscheinlichkeit mit der eine Test-Sequenz ein funktionelles PTS1-Motiv enthält in Form eines Zahlenwerts (P-Score; Neuberger *et al*, 2003a, 2003b). Ein positiver Wert spricht für eine peroxisomale Lokalisierung.

Bei der näheren Betrachtung der PTS1-Signale fiel die starke Konservierung der letzten vier Aminosäuren auf, wohingegen die Aminosäure-Reste an den übrigen Positionen des Dodekamers sehr variabel waren. Die Untersuchung weiterer Homologe zeigte jedoch, dass die letzten vier Aminosäuren mit Ausnahme des endständigen Leucin-Rests ebenfalls eine eingeschränkte Variabilität besitzen. Die Ptc5 Homologe von *Phycomyces blakesleeanus* und *Kazachstania naganishii* enden beispielsweise auf die Sequenz -WARL* (P-score: 3,053) bzw. -RANL* (P-Score: 9,847).

Die TMD der Ptc5-ähnlichen Proteine von *Coprinopsis cinerea* und *Schizophyllum commune* befindet sich sehr nah am N-Terminus. Möglicherweise wurde in diesen beiden Fällen die Presequenz durch die Algorithmen fälschlicherweise als TMD prognostiziert, da Presequenzen ebenfalls hydrophob sind. Proteine mit einer Ähnlichkeit zu Ptc5 konnten auch in Pflanzen und Tieren identifiziert werden. Allerdings wies keines der untersuchten Polypeptide ein PTS1-Motiv auf.

2.3 Untersuchung der Proteinphosphatase Ptc5 in *S. cerevisiae*

Zu Beginn dieser Arbeit waren für Ptc5 bereits einige Daten bezüglich der möglichen Funktion und der subzellulären Lokalisierung der Phosphatase in *S. cerevisiae* bekannt (Krause-Buchholz *et al*, 2006; Gey *et al*, 2008; Vögtle *et al*, 2012). Aus diesem Grund wurde die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommene Charakterisierung von Ptc5 in *S. cerevisiae* durchgeführt. Die Bäckerhefe eignet sich sehr gut zur Beantwortung von zellbiologischen Fragestellungen, da aufgrund der exzellenten genetischen Zugänglichkeit ausgefeilte Vektorsysteme und Kollektionen aller lebensfähigen Mutanten etabliert wurden (Janke *et al*, 2004; Winzeler *et al*, 1999). Das Genom wurde Mitte der neunziger Jahre als erstes eukaryotisches Genom vollständig sequenziert (Goffeau *et al*, 1996). Für die nachfolgenden Experimente wurde der Hefestamm BY4741 genutzt. In einigen Fällen wurde Deletionsmutanten der Euroscarf Bibliothek mit dem Stammhintergrund BY4742 verwendet.

2.3.1 Ptc5 weist eine duale Lokalisierung in Mitochondrien und Peroxisomen auf

Für die Analyse der subzellulären Lokalisierung von Ptc5 wurde zunächst eine C-terminale Fusion mit tagRFP (von jetzt an als RFP bezeichnet; Merzlyak *et al*, 2007) generiert (Ptc5-RFP). Die Fusion mit RFP maskiert das C-terminale PTS1-Motiv. Daher wurde ein weiteres Fusionsprotein erzeugt (Ptc5-RFP-PTS), indem RFP gefolgt von dem PTS1 von Ptc5 an den C-Terminus von Ptc5 angehängt wurde. In diesem und weiteren Abschnitten beschriebene Ptc5 RFP-Fusionsproteine wurden unter Kontrolle des *tefl* Promotors in einen frei replizierenden Vektor inseriert. Abweichungen von dieser Vorgehensweise werden im Text erwähnt.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass sowohl Ptc5-RFP als auch Ptc5-RFP-PTS in Mitochondrien lokalisierten, in denen sich auch das mitochondrielle Membranprotein Tim50-YFP befand (Abbildung 3A). Tim50 ist ein Rezeptor der inneren mitochondrialen Membran, der vom TOM-Komplex kommende Preproteine erkennt und an den TIM23-Komplex weitergibt (Geissler *et al*, 2002). Ptc5-RFP-PTS akkumulierte zusätzlich in Peroxisomen. Es ko-lokalisierte mit dem peroxisomalen ATP-Transporter Ant1-YFP (Abbildung 8B; Palmieri *et al*, 2001; van Roermund *et al*, 2001). Die Deletion der Gene, die für den Importrezeptor Pex5 bzw. für weitere am Import von PTS1-Proteinen beteiligte Peroxine kodieren, führte zu einer rein mitochondrialen Lokalisierung von Ptc5-RFP-PTS (Abbildung 3B und Abbildung 4). Die peroxisomale Lokalisierung von Ptc5 hängt daher vom C-terminalen PTS1-Motiv und einer intakten peroxisomalen Importmaschinerie ab.

Peroxisomen von *S. cerevisiae* besitzen unter Standardbedingungen einen Durchmesser von ca. 200 nm (Veenhuis *et al.*, 1987). Sie unterschreiten somit die Auflösungsgrenze des Fluoreszenzmikroskops von ca. 250 nm. Es ist daher mittels Fluoreszenzmikroskopie nicht genau festzustellen, ob Ptc5-RFP-PTS vollständig in Peroxisomen transloziert oder Mitochondrien und Peroxisomen in enge räumliche Nähe zueinander bringt.

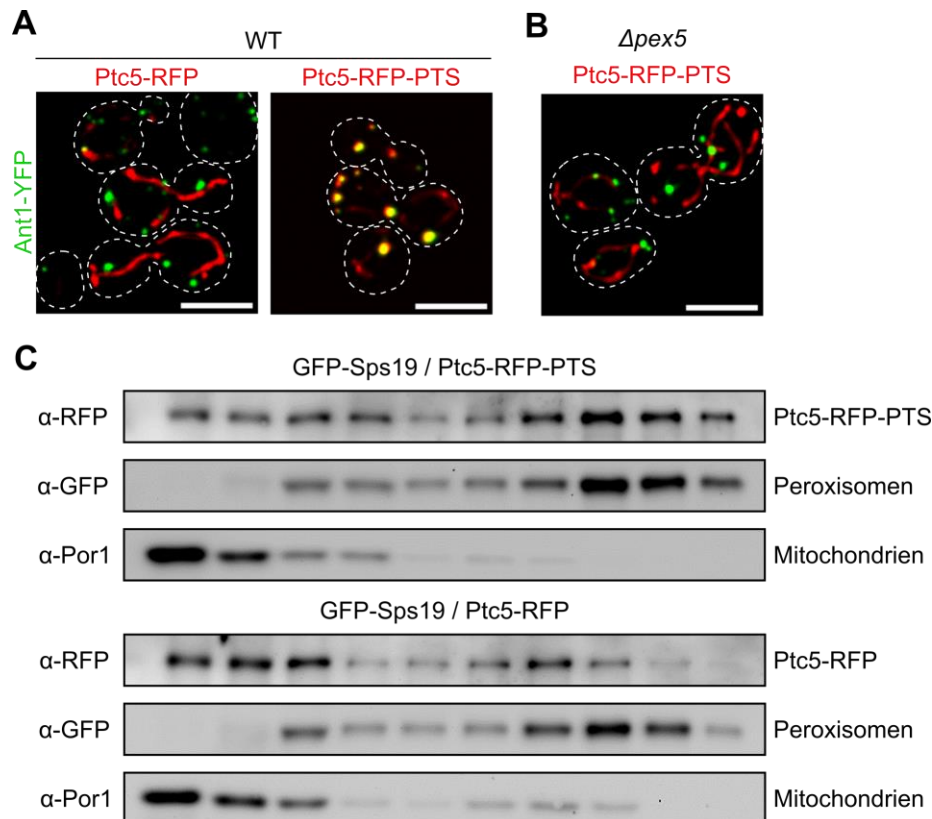


Abbildung 3: Duale Lokalisierung von Ptc5-RFP-PTS in Mitochondrien und Peroxisomen. **A.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Hefezellen, die Ptc5-RFP oder Ptc5-RFP-PTS mit dem peroxisomalen Membranprotein Ant1-YFP ko-exprimierten. Die gestrichelten Linien stellen die Zellumrisse dar. Der Größenstandard entspricht 5 μ m. **B.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von $\Delta pex5$ Zellen, welche Ptc5-RFP-PTS und Ant1-YFP ko-exprimierten. Die gestrichelten Linien stellen die Zellumrisse dar. Der Größenstandard entspricht 5 μ m. **C.** Zellorganellen der angegebenen Stämme wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation separiert. Die Fraktionen wurden mit steigender Dichte von links nach rechts auf ein SDS-Acrylamid-Gel geladen und mit Western Blot analysiert. Mitochondrien und Peroxisomen wurden mit den Markerproteinen Por1 bzw. GFP-Sps19 detektiert.

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurden Zellorganellen aus den entsprechenden Stämmen präpariert und aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte auf einem Iodixanol-Gradienten voneinander getrennt. Die Organellen wurden aus Zellen isoliert, die 24 Stunden in Ölsäure-haltigem Medium inkubiert wurden. Dies führt durch die Induktion der peroxisomalen β -Oxidation zu einer stark erhöhten Dichte der Peroxisomen und verbessert die Trennung von Mitochondrien und Peroxisomen (Veenhuis *et al.*, 1987; Cramer *et al.*, 2015). Mitochondrien wurden durch das Membranprotein Por1 nachgewiesen. Por1 ist ein Porin, das in der äußeren mitochondriellen Membran verankert ist (Mihara & Sato, 1985). Die Detektion

peroxisomaler Fraktionen erfolgte mit Hilfe des Markerproteins GFP-Sps19. Sps19 ist eine 2,4-dienoyl-CoA Reduktase und befindet sich in der peroxisomalen Matrix (Gurvitz *et al*, 1997). Beide Ptc5-Fusionen wurden in Fraktionen von geringer Dichte detektiert, in denen sich auch Por1 befand (Abbildung 3C). Ptc5-RFP-PTS migrierte darüber hinaus gemeinsam mit GFP-Sps19 in Fraktionen von hoher Dichte. Ptc5 wird daher sowohl Mitochondrien als auch Peroxisomen importiert.

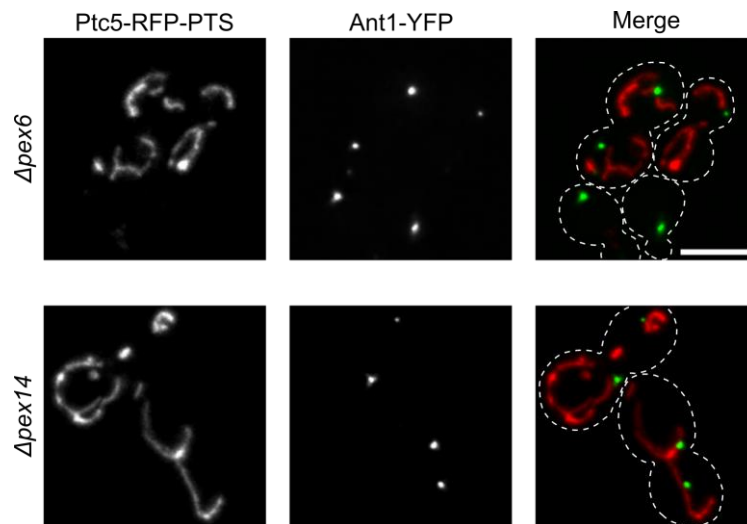


Abbildung 4. Die peroxisomale Lokalisierung von Ptc5-RFP-PTS hängt von Pex6 und Pex14 ab. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von $\Delta pex6$ und $\Delta pex14$ Zellen, die Ptc5-RFP-PTS und Ant1-YFP ko-exprimierten. Zellumrisse sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Der Größenstandard entspricht 5 μm .

Um eine mögliche Veränderung der subzellulären Lokalisierung von Ptc5 durch die Fusion mit RFP zu überprüfen, wurde der Aufenthaltsort des endogenen Proteins untersucht.

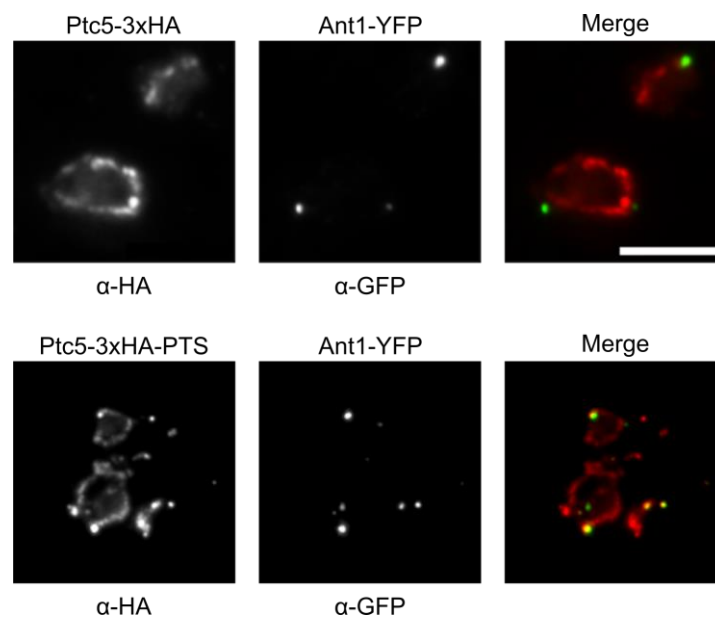


Abbildung 5: Endogenes Ptc5 lokalisiert in Mitochondrien und Peroxisomen. Endogenes Ptc5 wurde am C-Terminus mit drei HA-Tags (Ptc5-3xHA) oder drei HA-Tags gefolgt von dem PTS1 von Ptc5 (Ptc5-3xHA-PTS) markiert. Die Fusionsproteine und das peroxisomale Membranprotein Ant1-YFP wurden immuncytochemisch visualisiert. Unterhalb der Bilder sind die verwendeten Antikörper angegeben. Der Größenstandard entspricht 5 μm .

Zu diesem Zweck wurde Ptc5 am C-Terminus mit einem dreifachen HA-Tag (Ptc5-3xHA) oder mit einem dreifachen HA-Tag gefolgt von dem PTS1 von Ptc5 (Ptc5-3xHA-PTS) markiert. Die Lokalisierung der Fusionen wurde anschließend immuncytochemisch untersucht. Beide Fusionsproteine wurden in Mitochondrien detektiert (Abbildung 5). Ptc5-3xHA-PTS akkumulierte zusätzlich in Peroxisomen. Eine Quantifizierung der mit Ant1-YFP ko-lokalisierenden Foci der Fusionsproteine ergab, dass 21,4% der Foci von Ptc5-3xHA mit Ant1-YFP überlappten. Die Foci von Ptc5-3xHA-PTS überlappten dagegen in 47,1% aller Fälle mit dem peroxisomalen Marker. Diese Daten zeigen, dass Ptc5 auch unter endogenen Bedingungen eine duale Lokalisierung in Mitochondrien und den Peroxisomen aufweist.

2.3.2 Ptc5p wird über Mitochondrien indirekt in Peroxisomen transportiert

Die duale Lokalisierung von Ptc5 in Mitochondrien und Peroxisomen warf die Frage nach dem Mechanismus für die Verteilung der Phosphatase auf. Ptc5 konnte bereits im mitochondriellen Intermembranraum detektiert werden. Die korrekte Lokalisierung des Proteins hängt von dessen Prozessierung durch die Peptidase der inneren mitochondrialen Membran Imp1 ab (Vögtle *et al.*, 2012). Daher wurde der Einfluss der Deletion von *imp1* auf die Lokalisierung von Ptc5-RFP-PTS in untersucht.

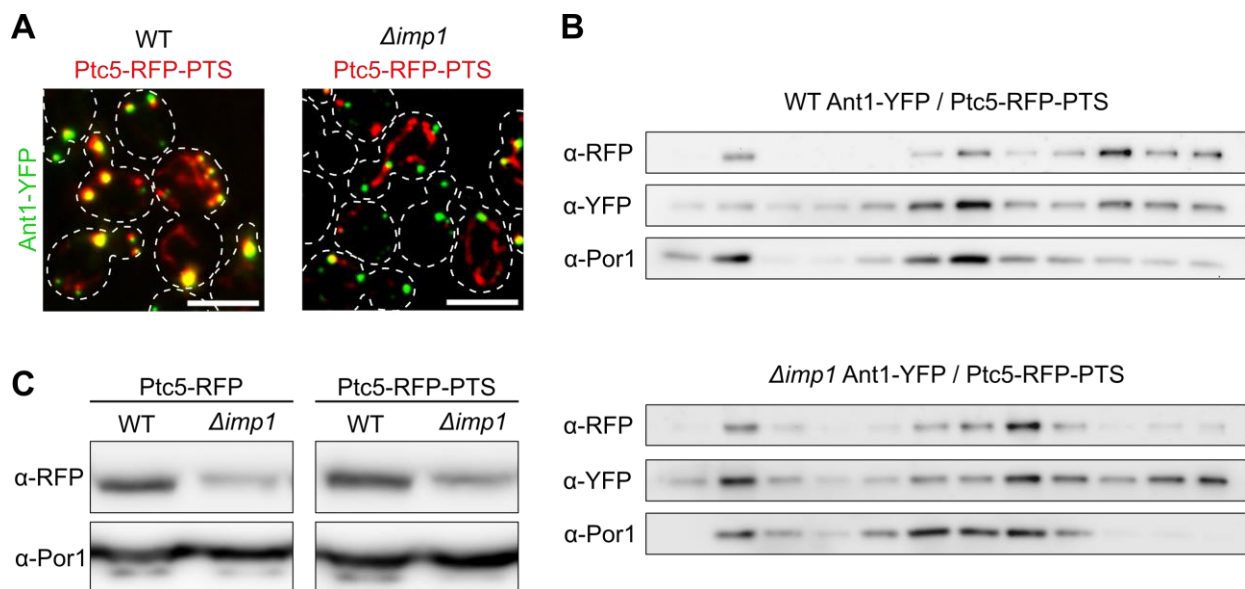


Abbildung 6: Die peroxisomale Lokalisierung von Ptc5p ist abhängig von der mitochondrialen Peptidase Imp1. **A.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von WT und $\Delta imp1$ Zellen, die Ptc5-RFP-PTS und Ant1-YFP ko-exprimierten. Die gestrichelten Linien stellen die Zellumrisse dar. Der Größenstandard beträgt 5 μm . **B.** Zellorganellen der in A. gezeigten Stämme wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation separiert. Die Fraktionen wurden mit steigender Dichte von links nach rechts auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel geladen und mittels Western Blot analysiert. Mitochondrien und Peroxisomen wurden mit den Markerproteinen Por1 bzw. Ant1-YFP detektiert. **C.** Western Blot von Gesamtprotein-Extrakten der angegebenen Stämme.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Ptc5-RFP-PTS in $\Delta imp1$ Zellen ausschließlich in Mitochondrien akkumulierte (Abbildung 6A). Die Lokalisierung wurde ebenfalls biochemisch durch subzelluläre Fraktionierung analysiert. Die Dichte der Peroxisomen konnte in diesem Fall nicht durch die Inkubation der Zellen in Ölsäure-haltigem Medium erhöht werden, da $\Delta imp1$ Zellen aufgrund eines Defekts in der Zellatmung nicht in der Lage sind, Fettsäuren als Kohlenstoffquelle zu nutzen (Nunnari *et al*, 1993). Ptc5-RFP-PTS befand sich im Wildtyp und in der $imp1$ Mutante gemeinsam mit dem mitochondriellen Marker Por1 in Fraktionen mit geringer Dichte (Abbildung 6B). Im Wildtyp migrierte das Fusionsprotein zudem in Fraktionen mit hoher Dichte, die auch Ant1-YFP beinhalteten. In der $imp1$ Deletionsmutante konnte in diesen Fraktionen Ptc5-RFP-PTS nicht nachgewiesen werden.

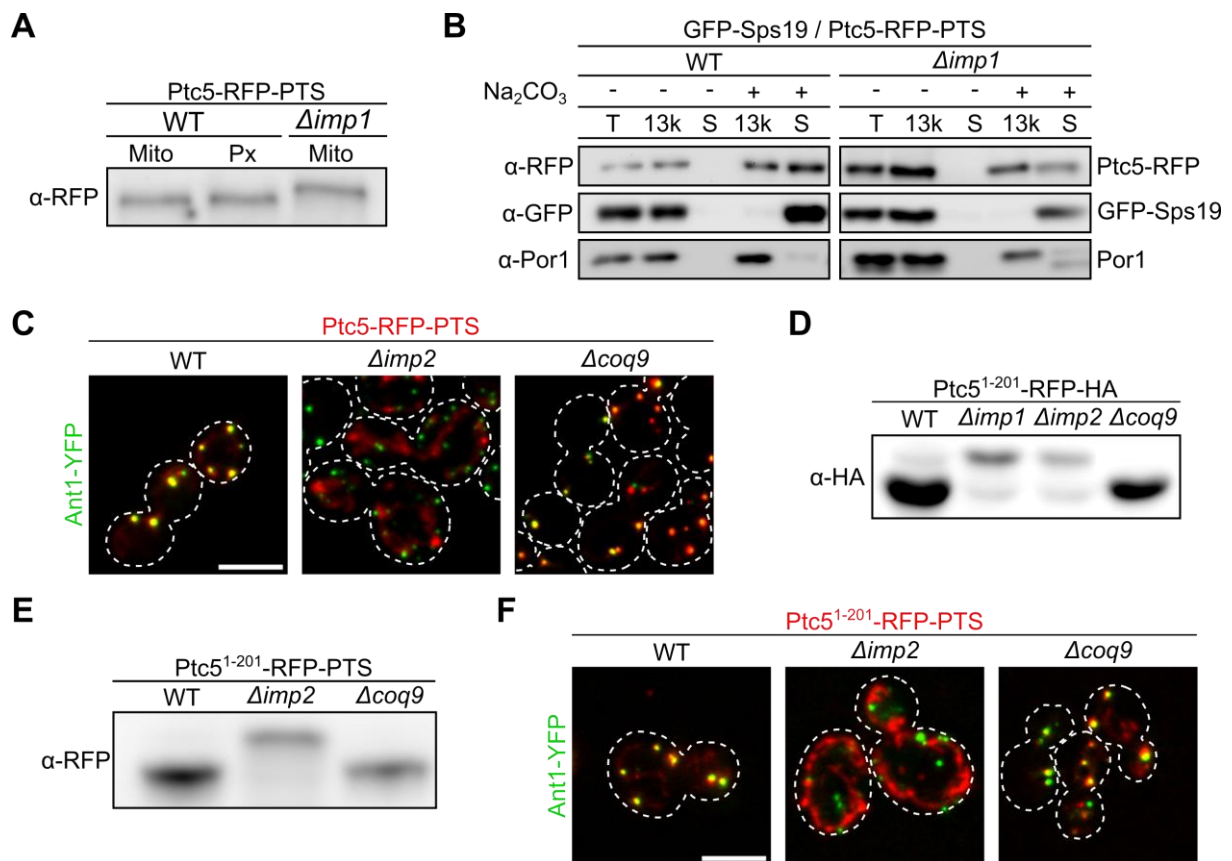


Abbildung 7. Ptc5 wird über Mitochondrien zu Peroxisomen transportiert. **A.** Hochauflösende SDS-PAGE gefolgt von Western-Blotting mitochondrieller und peroxisomaler Fraktionen von Ptc5-RFP-PTS aus WT und $\Delta imp1$ Zellen. Die mitochondrielle und peroxisomale Fraktion des WT stammten aus Fraktion 7 bzw. 10 des in Abbildung 6B gezeigten Dichtegradienten. Die Fraktion von $imp1$ stammte aus Fraktion 8. **B.** Carbonat-Extraktion von WT und $\Delta imp1$ Zellen, welche Ptc5-RFP-PTS und GFP-Sps19 exprimierten. **C.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von WT, $\Delta imp2$ und $\Delta coq9$ Zellen, die Ptc5-RFP-PTS und Ant1-YFP exprimierten. **D.** Western Blot der C-terminal verkürzten RFP-Fusion Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA in WT, $\Delta imp1$, $\Delta imp2$, $\Delta coq9$ Zellen. **E.** Western-Blot von Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-PTS aus WT, $\Delta imp2$ und $\Delta coq9$ Zellen. **F.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von WT, $\Delta imp2$ und $\Delta coq9$ Zellen, welche Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-PTS und Ant1-YFP ko-exprimierten. Zellumrisse sind in C. und F. mit gestrichelten Linien dargestellt. Der Größenstandard in C. und F. entspricht 5 μ m.

Die Proteinmenge der Fusionsproteine war in *Δimp1* Zellen im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert, was für eine verringerte Proteinstabilität der nicht-prozessierten Polypeptide spricht (Abbildung 6C). Überraschenderweise ist anscheinend die Prozessierung durch die Peptidase Imp1 in Mitochondrien notwendig für die peroxisomale Lokalisierung von Ptc5.

Die Prozessierung durch Imp1 erzeugt eine N-terminal verkürzte Isoform von Ptc5 (Vögtle *et al.*, 2012). Daher wurden peroxisomale und mitochondrielle Fraktionen von Ptc5-RFP-PTS der in Abbildung 6B gezeigten Dichtegradienten durch hoch-auflösende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blotting analysiert. Mitochondrielles und peroxisomales Ptc5-RFP-PTS aus wildtypischen Extrakten migrierte schneller durch das Polyacrylamid-Gel als das Fusionsprotein aus der mitochondriellen Fraktion von *Δimp1* Zellen (Abbildung 7A). Ptc5 wird durch die Prozessierung durch Imp1 aus der inneren mitochondriellen Membran in den Intermembranraum freigesetzt. Die Löslichkeit von Ptc5 im WT und der *imp1* Mutante wurde daher durch eine Carbonat-Extraktion untersucht. Carbonat setzt peripher gebundene Membranproteine und Matrixproteine ins Cytosol frei (Fujiki *et al.*, 1982). Im WT war Ptc5-RFP-PTS größtenteils löslich während das Fusionsprotein in *Δimp1* Zellen überwiegend membrangebunden vorlag (Abbildung 7B). Als Kontrolle dienten das peroxisomale Matrixprotein GFP-Sps19 und das mitochondrielle Membranprotein Por1. GFP-Sps19 wurde vollständig freigesetzt, während das Membranprotein Por1 überwiegend im Membranpellet verblieb. Diese Ergebnisse zeigen, dass Ptc5 zuerst in Mitochondrien durch Imp1 prozessiert und anschließend in Peroxisomen importiert wird.

Die Lokalisierung von Ptc5-RFP-PTS wurde auch in *Δimp2* Zellen analysiert. Imp2 ist die zweite katalytische Untereinheit des IMP-Komplexes. In Abwesenheit von Imp2 lokalisierte Ptc5-RFP-PTS ausschließlich in Mitochondrien (Abbildung 7C). Die Deletion von *imp1* oder *imp2* verursacht eine Funktionsstörung der Atmungskette (Nunnari *et al.*, 1993). Um festzustellen, ob die fehlende peroxisomale Lokalisierung von Ptc5 in *Δimp1* und *Δimp2* Zellen durch einen unspezifischen mitochondriellen Defekt hervorgerufen wird, wurde Ptc5-RFP-PTS ebenfalls in *Δcoq9* Zellen exprimiert. Coq9 lokalisiert in der inneren mitochondriellen Membran und wird für die Biosynthese von Ubiquinon und daher auch für die Zellatmung benötigt (Johnson *et al.*, 2005). Die Lokalisierung von Ptc5-RFP-PTS in der *coq9* Mutante war mit der des Wildtyps vergleichbar (Abbildung 7C).

Um die Auftrennung zwischen dem Preprotein und der reifen Isoform von Ptc5 im Polyacrylamid-Gel zu erhöhen, wurde das C-terminal trunkierte Ptc5-Allel Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA erzeugt. Im WT und in *Δcoq9* Zellen wurde das Allel vollständig prozessiert, während die Deletion von *imp1* oder *imp2* die Prozessierung blockierte (Abbildung 7D). Der HA-Tag von

Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA wurde anschließend durch das PTS1-Signal von Ptc5 ersetzt, um die Lokalisierung des trunkierten Proteins zu analysieren. Die Prozessierung und die Lokalisierung von Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-PTS war in WT, *Δimp2* und *Δcoq9* Zellen vergleichbar mit Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA bzw. Ptc5-RFP-PTS (Abbildung 7E und F). Diese Ergebnisse bestätigen, dass Ptc5 in Mitochondrien durch Imp1 prozessiert und anschließend in Peroxisomen importiert wird. Die defekte Prozessierung und fehlende peroxisomale Lokalisierung von Ptc5 in *Δimp2* Zellen wird möglicherweise durch die Destabilisierung von Imp1 in Abwesenheit von Imp2 verursacht (Nunnari *et al*, 1993).

2.3.3 Die Deletion der Imp1-Spaltstelle verhindert die peroxisomale Lokalisierung von Ptc5

Da *imp1* Mutanten keine funktionelle Zellatmung besitzen, würde die Identifikation und anschließende Mutation der Imp1-Spaltstelle von Ptc5 es ermöglichen, den Effekt der Spaltung auf die Lokalisierung der Phosphatase unabhängig von weiteren durch die Deletion von *imp1* hervorgerufenen Veränderungen zu studieren. Für die Bestimmung der Imp1-Spaltstelle wurde zunächst Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA aus WT und *Δimp1* Zellen immunpräzipitiert.

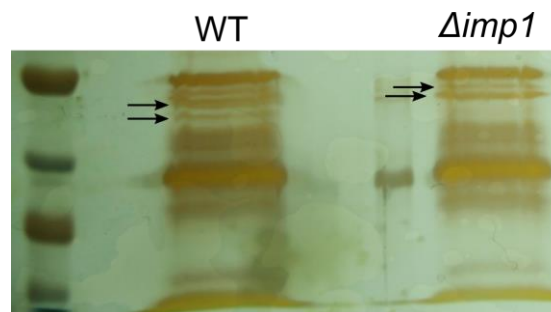


Abbildung 8. Silbernitrat-gefärbte Immunpräzipitate von Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA. Das trunkierte Ptc5-Allel Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA wurde aus WT und *Δimp1* Zellen immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit Silbernitrat angefärbt und die mit Pfeilen markierten Banden wurden von J. Kahnt (Max-Planck-Institut Marburg) aus dem Gel eluiert und massenspektroskopisch analysiert.

Die isolierten Proteine wurden mit Hilfe einer Silberfärbung visualisiert (Abbildung 8). Einzelne Banden wurden aus dem Gel auf Höhe des geschätzten Molekulargewichts der beiden Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA Isoformen ausgeschnitten und massenspektroskopisch untersucht. Anhand der Peptidabdeckung von Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA aus dem WT und der *imp1* Mutante konnte gezeigt werden, dass Ptc5 zwischen Aminosäure 83 und 84 gespalten wird (Abbildung 9A). Der Aspartat-Rest an Position 84 ist ein starker Hinweis auf eine Imp1-spezifische Spaltstelle, da Imp1 einen Aspartat- oder Glutamat-Rest an dieser Position bevorzugt (Luo *et al*, 2006). In der *imp1* Mutante fehlten lediglich die ersten 35 Aminosäuren von Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA, was der

Länge der vorhergesagten Presequenz entspricht. Die Position der Imp1-Schnittstelle von Ptc5 wurde durch eine Serie von Trunkationen und Punktmutationen überprüft. Eine Western-Blot Analyse zeigte, dass das Ptc5-Allel Ptc5¹⁻⁸⁰-RFP-HA nicht durch Imp1 gespalten wurde (Abbildung 9B). Ptc5¹⁻⁸⁵-RFP-HA wurde teilweise von Imp1 prozessiert und Ptc5¹⁻⁹⁰-RFP-HA wurde nahezu vollständig gespalten. Für die effiziente Prozessierung von Ptc5 werden daher möglicherweise zusätzliche Aminosäure-Reste stromabwärts der Imp1-Spaltstelle benötigt. Die Substitution des sauren Aspartat-Rests an Position 84 durch einen basischen Lysin-Rest in Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA wirkte sich ebenfalls negativ auf die Spaltung aus (Abbildung 9C). Die Deletion der Sequenz LSLD von Position 81 bis 84 in Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA verhinderte die Spaltung durch Imp1 vollständig (Abbildung 9D). Die Deletion dieser Sequenz in Ptc5-RFP-PTS führte zu einer rein mitochondrialen Lokalisierung des Fusionsproteins (Abbildung 9E). Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Prozessierung durch Imp1 eine Voraussetzung für die peroxisomale Lokalisierung von Ptc5 ist.

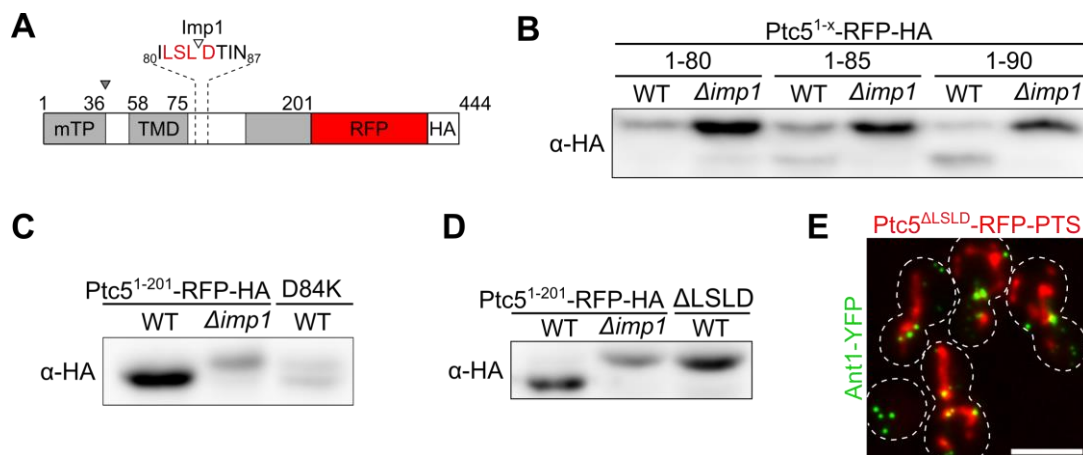


Abbildung 9. Die Deletion der Imp1-Schnittstelle verhindert die peroxisomale Lokalisierung von Ptc5. **A.** Schematische Darstellung von Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA. Die Imp1-Spaltstelle ist in roten Buchstaben angegeben. Der graue Pfeil zeigt die Position der Prozessierung durch die mitochondriale Prozessierungs-Peptidase an. **B.** Western Blot von C-terminal trunkierten Ptc5-Fusionen aus WT und $\Delta imp1$ Zellen. **C.** Western Blot von Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA aus WT und $\Delta imp1$ Zellen sowie von einer Punktmutante, in der Aspartat an Position 84 durch Lysin ersetzt wurde. **D.** Western Blot von Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA aus WT und $\Delta imp1$ Zellen sowie von einer Mutante des Fusionsproteins ohne die Aminosäuren LSLD (AA 81-84) der Imp1-Schnittstelle. **E.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellen, welche Ant1-YFP und Ptc5^{ΔLSLD}-RFP-PTS ko-exprimierten. Zellumrisse sind als gestrichelte Linien dargestellt. Der Größenstandard entspricht 5 μ m.

2.3.4 Die duale Lokalisierung von Ptc5 basiert auf einem molekularen Tauziehen

Ptc5-RFP wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop nur in Mitochondrien und nicht im Cytosol beobachtet (Abbildung 3A). Auch wurde Ptc5-RFP-PTS in Abwesenheit von Pex5, Pex6 oder Pex14 nicht im Cytosol detektiert (Abbildung 3B und Abbildung 4). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass die Bindung des PTS1-Motivs von Ptc5 durch Pex5 während des mitochondrialen Imports eine Voraussetzung für die peroxisomale Lokalisierung der

Phosphatase sein könnte (Abbildung 10). Die Bindung von Pex5 könnte die peroxisomale Importmaschinerie dazu befähigen Ptc5 nach dessen Prozessierung durch Imp1 aus Mitochondrien herauszuziehen und in Peroxisomen zu überführen. Es wurden jedoch auch einige Proteine beschrieben, die mit Hilfe eines alternativen Mechanismus während des mitochondriellen Imports teilweise zurück ins Cytosol translozieren (Retro-Translokation; (Stein *et al*, 1994; Regev-Rudzki *et al*, 2005). Der rasche Abbau der Ptc5 Fusionsproteine nach einer hypothetischen Pex5-unabhängigen Retro-Translokation ins Cytosol bietet somit auch eine denkbare Erklärung für die in dieser Arbeit beobachtete Lokalisierung. Aus diesem Grund wurde das Ptc5-Allel Ptc5^{Δ1-83}-RFP generiert, das keine funktionellen Zielsteuerungs-Signale mehr enthält. Die Deletion der ersten 83 Aminosäuren imitiert die Prozessierung durch Imp1. Ptc5^{Δ1-83}-RFP war im Fluoreszenzmikroskop deutlich im Cytosol sichtbar und die Proteinmenge war mit dem Volllängen-Protein Ptc5-RFP-PTS vergleichbar (Abbildung 11A und B). Durch das Anfügen des PTS1 von Ptc5 wurde Ptc5^{Δ1-83}-RFP-PTS erzeugt. Das Fusionsprotein lokalisierte im WT in Peroxisomen während es in *Δpex5* Zellen im Zytosol lokalisierte (Abbildung 11C).

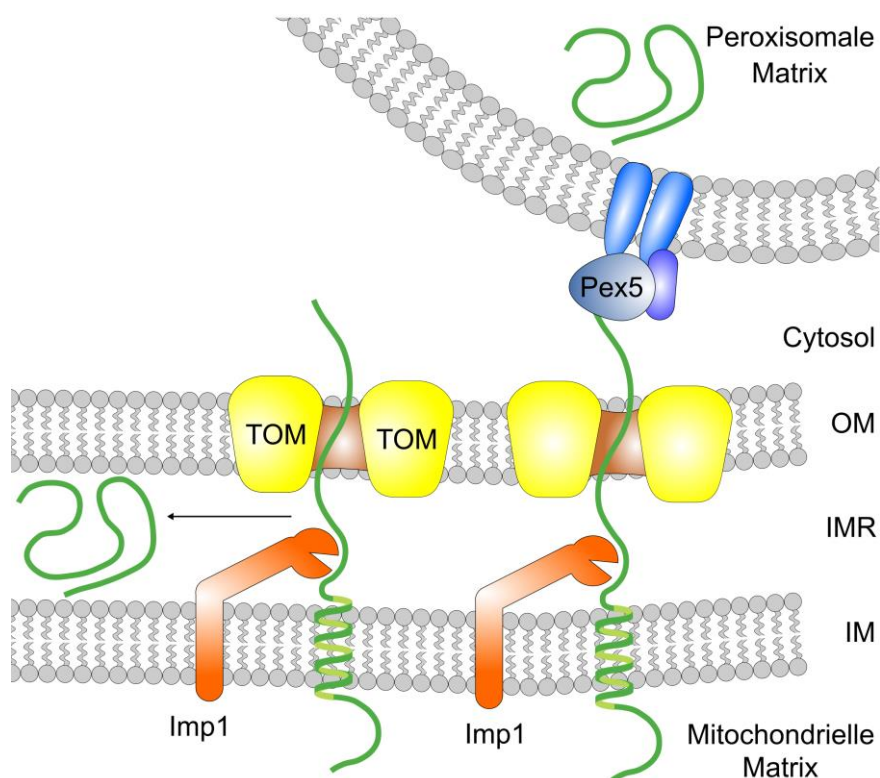


Abbildung 10. Modellvorstellung der dualen Lokalisierung von Ptc5 durch molekulares Tauziehen. Ptc5 (grün) wird durch die Interaktion der Presequenz mit dem Tom-Komplex (gelb) in Mitochondrien importiert und durch die Transmembrandomäne (grüne Helix) in der inneren mitochondrialen Membran verankert. Während des mitochondrialen Imports ragt ein Teil des C-Terminus von Ptc5 noch ins Cytosol. Ohne die Bindung von Pex5 (blau) an das PTS1 wird die Phosphatase vollständig importiert und nach der Prozessierung durch Imp1 in den Intermembranraum (IMR) freigesetzt. Die Bindung durch Pex5 blockiert den vollständigen Import von Ptc5. Durch die Interaktion von Pex5 mit Komponenten der peroxisomalen Importmaschinerie (blau) entsteht ein molekulares Tauziehen zwischen den beiden Translokasen. Nach der Prozessierung durch Imp1 kann die peroxisomale Importmaschinerie Ptc5 aus Mitochondrien herausziehen und in Peroxisomen importieren.

Diese Daten zeigen, dass Ptc5 im Cytosol stabil ist und dass ein direkter Import der Phosphatase in Peroxisomen möglich ist. Als Mechanismus für die Translokalisierung kommt demnach das in Abbildung 10 dargestellte Modell am ehesten in Betracht. Als nächstes wurde überprüft, ob der peroxisomale Import von Ptc5 auch stattfindet, wenn das Protein in die mitochondriale Matrix transportiert wird. Dazu wurde die Lokalisierung der Ptc5-Allele Ptc5^{ΔTM}-RFP und Ptc5^{ΔTM}-RFP-PTS untersucht, die noch die mitochondriale Presequenz, aber keine Transmembrandomäne mehr enthalten. Ptc5^{ΔTM}-RFP war ähnlich wie Ptc5-RFP gleichmäßig im mitochondrialen Netzwerk verteilt (Abbildung 11C). Ptc5^{ΔTM}-RFP-PTS lokalisierte ebenfalls im gesamten mitochondrialen Netzwerk. Zusätzlich akkumulierte das Fusionsprotein jedoch in distinkten Foci innerhalb der Mitochondrien, welche sich häufig in enger räumlicher Nähe zu Peroxisomen befanden (Abbildung 11C). Die Deletion von *pex5* resultierte in einer gleichmäßigen mitochondrialen Lokalisierung von Ptc5^{ΔTM}-RFP-PTS und verhinderte die Bildung der Foci (Abbildung 11C).

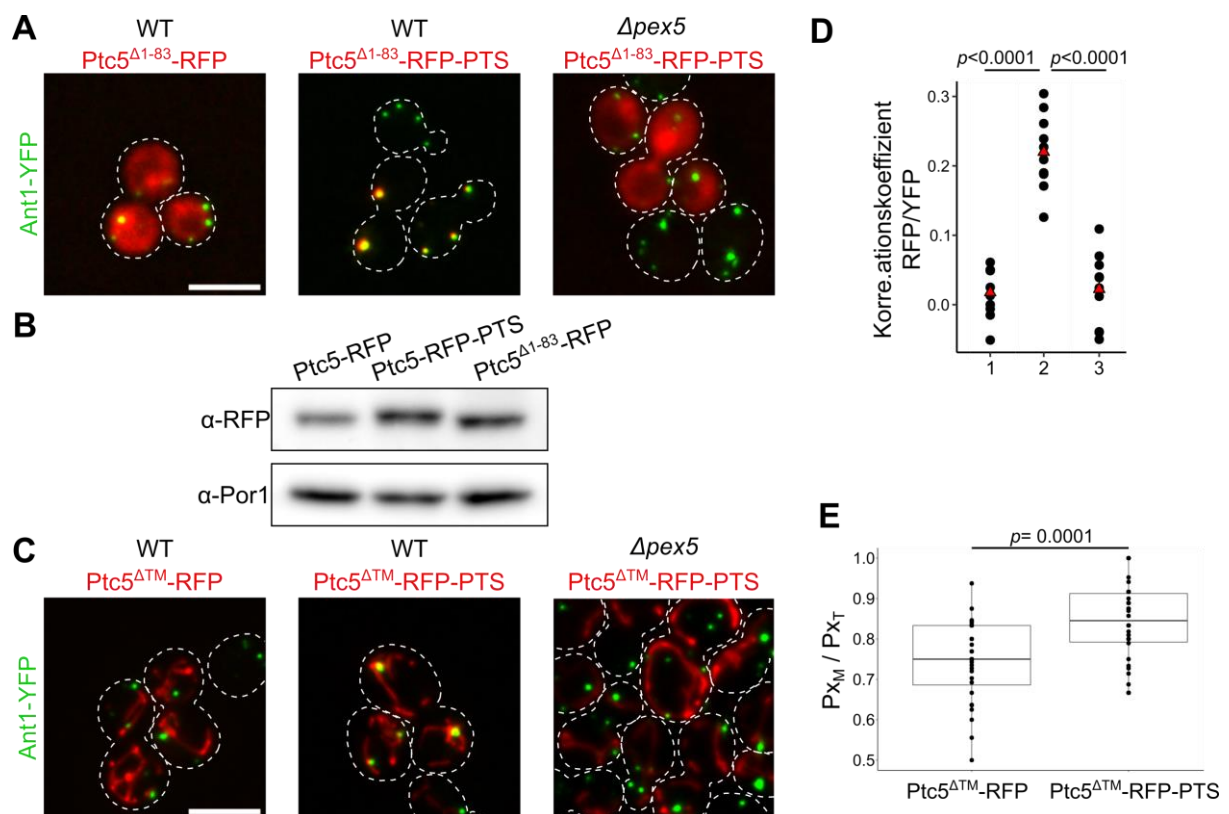


Abbildung 11. Ptc5 wird durch einen molekularen Tauzieh-Mechanismus zwischen Mitochondrien und Peroxisomen verteilt. **A.** Die Lokalisierung von $Ptc5^{\Delta 1-83}$ -RFP, $Ptc5^{\Delta 1-83}$ -RFP-PTS und Ant1-YFP wurde in WT und $\Delta pex5$ Zellen fluorezenzmikroskopisch untersucht. Die Zellumrisse sind als gestrichelte Linien dargestellt. Der Größenstandard entspricht 5 μ m. **B.** Western-Blot von WT Zellen, welche die angegebenen Konstrukte exprimierten. **C.** Fluorezenzmikroskopische Aufnahme von WT oder $\Delta pex5$ Zellen, welche $Ptc5^{\Delta TM}$ -RFP oder $Ptc5^{\Delta TM}$ -RFP-PTS mit Ant1-YFP ko-exprimierten. Die Zellumrisse sind als gestrichelte Linien dargestellt. Der Größenstandard entspricht 5 μ m. **D.** Bestimmung der Korrelationskoeffizienten des RFP- und YFP-Kanals der in C. gezeigten Stämme. 1: $Ptc5^{\Delta TM}$ -RFP im WT, 2: $Ptc5^{\Delta TM}$ -RFP-PTS im WT, 3: $Ptc5^{\Delta TM}$ -RFP-PTS in $\Delta pex5$. Die Mittelwerte der Datensätze sind als Dreiecke dargestellt. **E.** Boxplot von der Anzahl an Peroxisomen mit Kontakt zu Mitochondrien (Px_M) in Relation zu sämtlichen Peroxisomen (Px_T).

Die Pixel-für-Pixel Korrelation zwischen dem Signal von Ant1-YFP und Ptc5^{ΔTM}-RFP-PTS war im WT deutlich stärker als in der *pex5* Mutante und als die Korrelation zwischen dem Signal von Ant1-YFP und Ptc5^{ΔTM}-RFP (Abbildung 11D). Um die Wirkung der Bindungsstärke zwischen Pex5 und Ptc5 auf die duale Lokalisierung der Phosphatase zu untersuchen wurde das PTS1 von Ptc5-RFP-PTS gegen weniger effiziente PTS1-Motive ausgetauscht (Freitag *et al*, 2012).

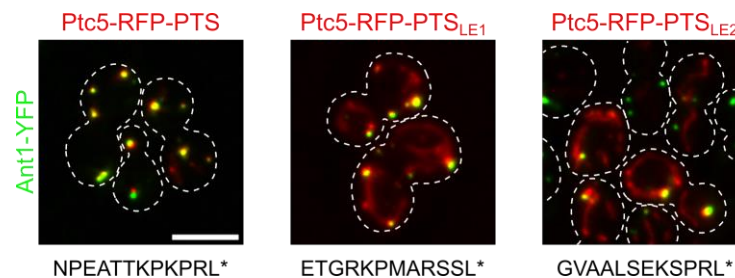


Abbildung 12. Die Lokalisierung von Ptc5 wird durch die Importeffizienz des PTS1 reguliert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen, die die angegebenen Ptc5-Fusionsproteine und Ant1-YFP ko-exprimierten. Das PTS1 von Ptc5-RFP-PTS wurde gegen das PTS1 der peroxisomalen Isoform der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Ptc5-RFP-PTS_{LE1}) bzw. der Phosphoglyceratkinase (Ptc5-RFP-PTS_{LE2}) von *A. nidulans* ausgetauscht. Unterhalb der Bilder ist die Sequenz des jeweiligen PTS1-Motivs angegeben. Die Zellumrisse sind als gestrichelte Linien dargestellt. Der Größenstandard beträgt 5 μ m.

Die PTS1-Sequenzen stammten von peroxisomalen Isoformen der glykolytischen Enzyme Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Ptc5-RFP-PTS_{LE1}) und Phosphoglyceratkinase (Ptc5-RFP-PTS_{LE2}) von *A. nidulans* (Freitag *et al*, 2012). Beide Fusionsproteine mit schwächerem PTS1 lokalisierten im Vergleich zu Ptc5-RFP-PTS verstärkt in Mitochondrien (Abbildung 12). Diese Daten sprechen dafür, dass die Bindungsstärke zwischen Pex5 und dem PTS1 die Verteilung von Ptc5 zwischen Mitochondrien und Peroxisomen kontrolliert.

Die in diesem Abschnitt präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die intrazelluläre Verteilung von Ptc5 sowohl durch die mitochondrielle als auch die peroxisomale Import-Maschinerie kontrolliert werden, welche das Polypeptid in entgegengesetzte Richtungen ziehen (Abbildung 10). Darüber hinaus deuten die Daten darauf hin, dass dieser Tauzieh-Mechanismus zusätzlich transiente Kontakte zwischen den beiden Zellorganellen erzeugen kann.

2.3.5 Ein synthetisches Membranprotein mit PTS1 erzeugt Kontakte zwischen dem ER und Peroxisomen

Die Vermittlung räumlicher Nähe zwischen zwei Zellorganellen wurde durch einen künstlichen Proteinanker näher untersucht. Dazu wurde mRFP oder mRFP gefolgt von dem PTS1 von Ptc5 an den offenen Leserahmen des ER-ständigen Membranproteins Sec63 fusioniert, dessen C-

Terminus ins Cytosol ragt (Rothblatt *et al*, 1989; Feldheim *et al*, 1992). Um eine konstante Expression der Fusionsproteine zu gewährleisten wurden die entsprechenden Konstrukte in einfacher Kopie ortsspezifisch ins Genom integriert. Beide RFP-Fusionen lokalisierten in bandförmigen Strukturen in der Zellperipherie und um den Zellkern (Abbildung 13). Diese Verteilung ist typisch für das Endoplasmatische Retikulum und wird insbesondere anhand der perinukleären Lokalisierung der mittleren Zelle von Sec63-mRFP deutlich, welche sich höchstwahrscheinlich zum Zeitpunkt der Aufnahme in der Anaphase befand (Preuss *et al*, 1991).

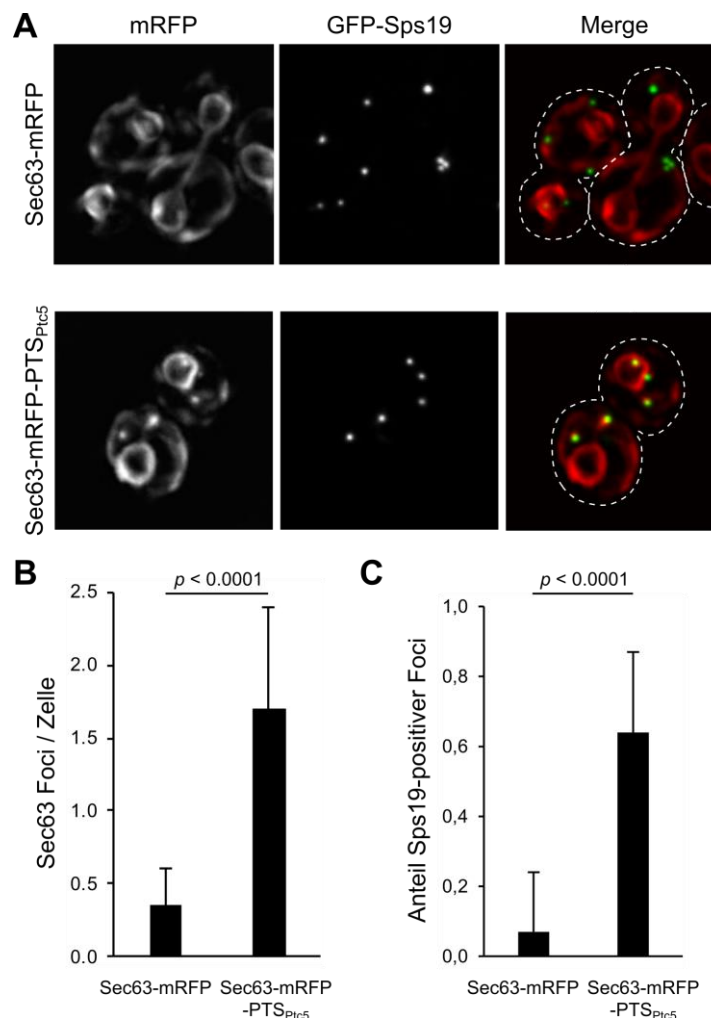


Abbildung 13. Sec63-mRFP-PTS generiert Kontakte zwischen dem ER und Peroxisomen. A. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen, welche Sec63-mRFP oder Sec63-mRFP-PTS_{Ptc5} gemeinsam mit GFP-Sps19 exprimierten. Der Größenstandard entspricht 5 μ m. **B.** Die Anzahl an Sec63 Foci wurde in den in A. gezeigten Stämmen quantifiziert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten an. **C.** Quantifizierung von Sec63 Foci mit Kontakt zu Peroxisomen der in A. gezeigten Stämme. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei Replikaten an.

Sec63-mRFP-PTS lokalisierte zusätzlich in Foci, welche häufig mit Ant1-YFP überlagerten (Abbildung 13). Kontakte zwischen zwei Zellorganellen können daher durch einen synthetischen Proteinanker bestehend aus einem Membranprotein und einem PTS1-Motiv etabliert werden.

2.3.6 Ptc5 dephosphoryliert die peroxisomale Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase Gpd1

Eine kürzlich veröffentlichte Phospho-Proteom Studie identifizierte die Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase Gpd1 als mögliches Substrat von Ptc5 (Guo *et al*, 2017). Gpd1 weist eine duale Lokalisierung im Cytosol und in Peroxisomen auf (Jung *et al*, 2010). Das Enzym ist an der peroxisomalen NADH Homöostase beteiligt (Al-Saryi *et al*, 2017). Aus diesem Grund wurde überprüft, ob Ptc5 die peroxisomale Fraktion von Gpd1 dephosphoryliert. Dafür wurden zunächst Zellorganellen aus dem WT und $\Delta ptc5$ Zellen isoliert, die Gpd1-GFP exprimierten. Peroxisomen wurden über einen Dichtegradienten von den restlichen Zellorganellen getrennt (Abbildung 14A) und der Phosphorylierungs-Status von intra-peroxisomalem Gpd1-GFP wurde mittels Phos-tag SDS-PAGE analysiert. Diese spezielle Form der Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht Rückschlüsse über den Phosphorylierungs-Grad von Proteinen anhand der Veränderung ihrer elektrophoretischen Mobilität. Durch die Interaktion eines dinukleären Metall-Komplexes mit phosphorylierten Aminosäure-Resten wird die Mobilität phosphorylierter Protein-Isoformen gesenkt (Kinoshita *et al*, 2009).

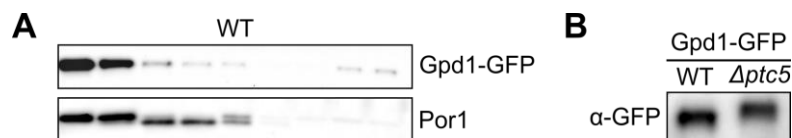


Abbildung 14: Ptc5 dephosphoryliert die peroxisomale Fraktion von Gpd1. **A.** Mikrosomen aus WT oder $\Delta ptc5$ Zellen, die endogen GFP-markierte Gpd1 exprimierten, wurden ihrer Dichte nach durch Zentrifugation aufgetrennt. Gezeigt ist ein Western Blot des Dichtegradienten des WT. Die Dichte der Fraktionen nimmt von links nach rechts zu. Die zwei schwersten Fraktionen enthalten peroxisomale Gpd1. **B.** Proteine einer peroxisomalen Fraktion aus WT und $\Delta ptc5$ Zellen wurden durch Phos-tag SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde Gpd1-GFP durch Western-Blotting detektiert.

In Abwesenheit von Ptc5 migrierte peroxisomales Gpd1-GFP langsamer durch das Phos-tag SDS-Polyacrylamidgel als das Fusionsprotein aus wildtypischen Peroxisomen (Abbildung 14B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Gpd1 in der peroxisomalen Matrix von Ptc5 dephosphoryliert wird.

2.3.7 Der indirekte Import von Ptc5 in Peroxisomen verhindert toxische Aktivität im Cytosol

Der indirekte Transport von Ptc5 über Mitochondrien zu Peroxisomen warf die Frage nach der biologischen Bedeutung dieses bisher nicht charakterisierten Mechanismus auf. Eine mögliche Funktion ist die Herstellung transientser Kontakte zwischen Peroxisomen und Mitochondrien

(Abbildung 11). Bei den Vorbereitungen der Mikroskopie der cytosolischen Ptc5 Variante Ptc5 Δ^{1-83} -RFP wurde zudem festgestellt, dass dessen Expression zu verlangsamten Zellwachstum führt. Im Gegensatz zu mitochondrialen Preproteinen, die ungefaltet transloziert werden, erfolgt der Import peroxisomaler Matrixproteine in vollständig gefaltetem und katalytisch aktivem Zustand (Wiedemann & Pfanner, 2017; Smith & Aitchison, 2013). Der indirekte Import von Ptc5 über Mitochondrien könnte daher eine schädliche Phosphatase-Aktivität im Cytosol verhindern. Diese Hypothese wurde durch einen Wachstumstest auf Minimalmedium überprüft. Tatsächlich resultierte die Expression von Ptc5 Δ^{1-83} -RFP in einem starken Wachstumsdefekt auf Glukose-haltigem Medium (Abbildung 15A). In Anwesenheit von Ethanol als alleinige Kohlenstoffquelle wurde nahezu kein Zellwachstum mehr beobachtet.

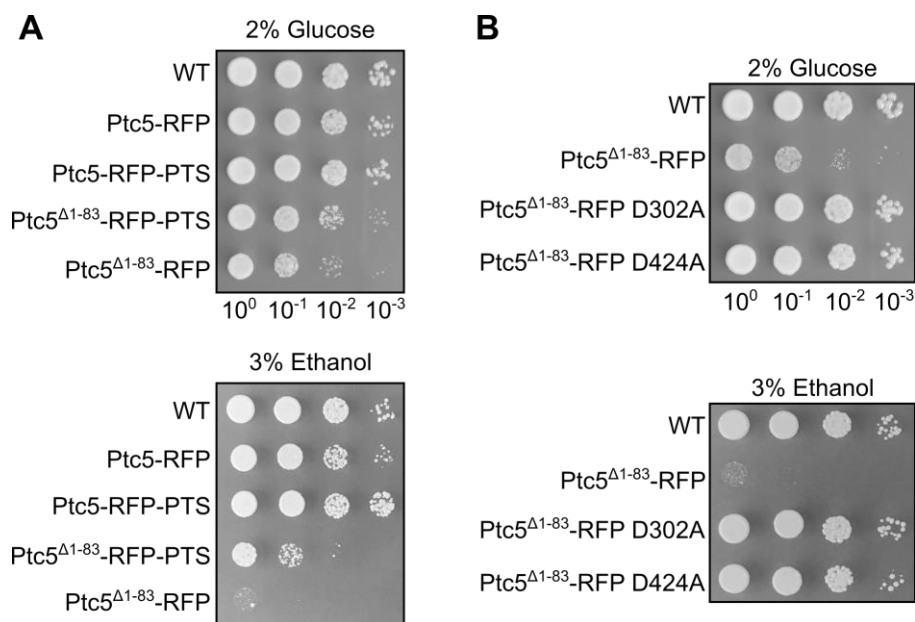


Abbildung 15. Der indirekte Import von Ptc5 in Peroxisomen verhindert toxische Phosphatase-Aktivität im Cytosol. **A.** Eine dekadische Verdünnungsreihe der angegebenen Stämme wurde auf Minimalmedium mit den angegebenen Kohlenstoffquellen getropft und zwei bis vier Tage bei 30°C inkubiert. Der WT Stamm enthielt das Ausgangsplasmid pCT310. Unterhalb der Platten in der oberen Reihe sind die jeweiligen Verdünnungsfaktoren angegeben. **B.** Der Wachstumstest mit den angegebenen Stämmen wurde wie in A. beschrieben durchgeführt.

Auch die Expression des direkt in Peroxisomen importierten Ptc5-Allels Ptc5 Δ^{1-83} -RFP-PTS führte unter beiden Bedingungen zu deutlichen Wachstumsdefekten im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 15A). Die Expression von Ptc5-RFP verursachte einen schwachen Wachstumsdefekt, während die Expression von Ptc5-RFP-PTS keine negativen Auswirkungen auf das Zellwachstum hatte. Die schädliche Wirkung des cytosolischen Ptc5-Allels Ptc5 Δ^{1-83} -RFP konnte durch Punktmutationen von zwei Aspartat-Resten an Position 302 bzw. 424 neutralisiert werden (Abbildung 15B). Daten zeigen, dass der indirekte Transport von Ptc5 über Mitochondrien zu Peroxisomen eine zellschädliche Phosphatase-Aktivität im Cytosol verhindert.

2.3.8 Untersuchung weiterer mitochondrieller Proteine mit PTS1

Die Entdeckung des neuen Verteilungsmechanismus durch molekulares Tauziehen warf die Frage auf, ob auch weitere Proteine ähnlich zwischen Peroxisomen und Mitochondrien aufgeteilt werden. Aus diesem Grund wurden durch Proteom-Analysen validierte mitochondrielle Proteine (Morgenstern *et al*, 2017) bioinformatisch auf die Anwesenheit eines PTS1-Motivs hin untersucht. In dieser Suche wurden 26 Kandidaten identifiziert, von denen 17 gemäß der Vorhersage durch das Programm PTS1 Predictor ein funktionelles PTS1 enthalten (Tabelle 2). Fünf Proteine, die Citrat-Synthase Cit2, die Katalase Cta1, die Carnitin-Acetyl-CoA Transferase Cat2, die Acyl-CoA Thioesterase Tes1 sowie das nicht charakterisierte Protein Pxp2 wurden bereits in Peroxisomen detektiert (Lewin *et al*, 1990; Petrova *et al*, 2004; Elgersma *et al*, 1995; Jones *et al*, 1999; Nötzel *et al*, 2016).

Tabelle 2: Mitochondrielle Proteine mit PTS1

Gen	Putatives PTS1	P-Score	Vorhersage
CAT2	ALENENKRKAKL *	11,229	Targeted
PTC5	NPEATTKPKPRL *	10,411	Targeted
MRP7	IARSRR AFLSKL *	9,854	Targeted
TES1	VYGSRDIRAKF *	9,571	Targeted
MSS2	KDSIKLLDKARL *	9,328	Targeted
CIT2	YKELVKNIESKL *	9,312	Targeted
PET309	RKSKRVLPVSKF *	8,830	Targeted
LYS4	KGGLEGWVKS QL *	8,383	Targeted
NSA1	VAASKASKKSKI *	7,400	Targeted
MIC10	FRSSAGLRSSKV *	7,189	Targeted
LYS12	TQQVDDVLSRL *	7,008	Targeted
DPI8	ATRRHLAHAPKL *	6,028	Targeted
CTA1	KHASELSSNSKF *	4,375	Targeted
MRS1	AGSSKFLKGA KI *	2,750	Targeted
MRPL37	QRIKQNNFLS QL *	1,700	Targeted
UTP6	RYKILDLIISK L *	0,611	Targeted
RML2	VKDRPRGKDAR L *	0,073	Targeted
PXP2	CGVSWKSGVVKL *	-1,169	Twilight zone
ATP8	RLYVSRLFIS KL *	-5,777	Twilight zone
SOD2	KEASRRFDAG KI *	-8,224	Twilight zone
MIN10	PISPIGNAGS QI *	-10,522	Not targeted
DSS1	DCLEGMLELE KL *	-16,365	Not targeted
NDE1	AKVYFLGRDSSI *	-17,919	Not targeted
TMA19	AIWKHGIVEE KI *	-20,006	Not targeted
EXG2	LAITIAALCAS L *	-24,671	Not targeted
CAT5	ICRVAIWSAERI *	-32,755	Not targeted

Genprodukte rot beschrifteter Gene wurden auf ihre Lokalisierung hin untersucht.

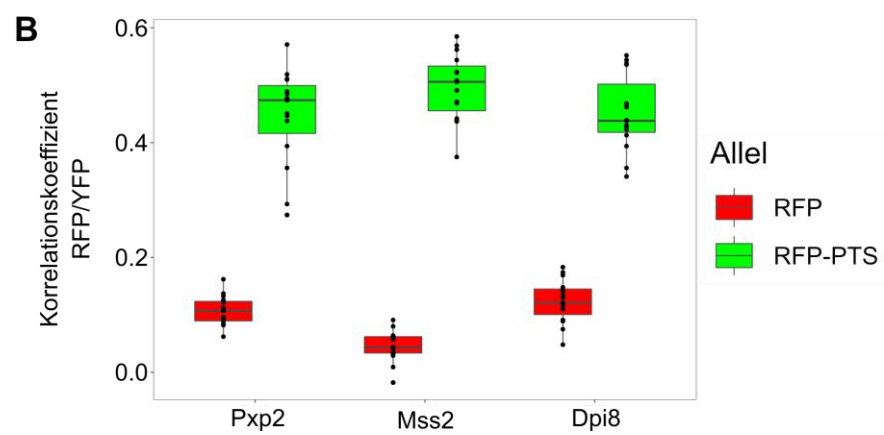
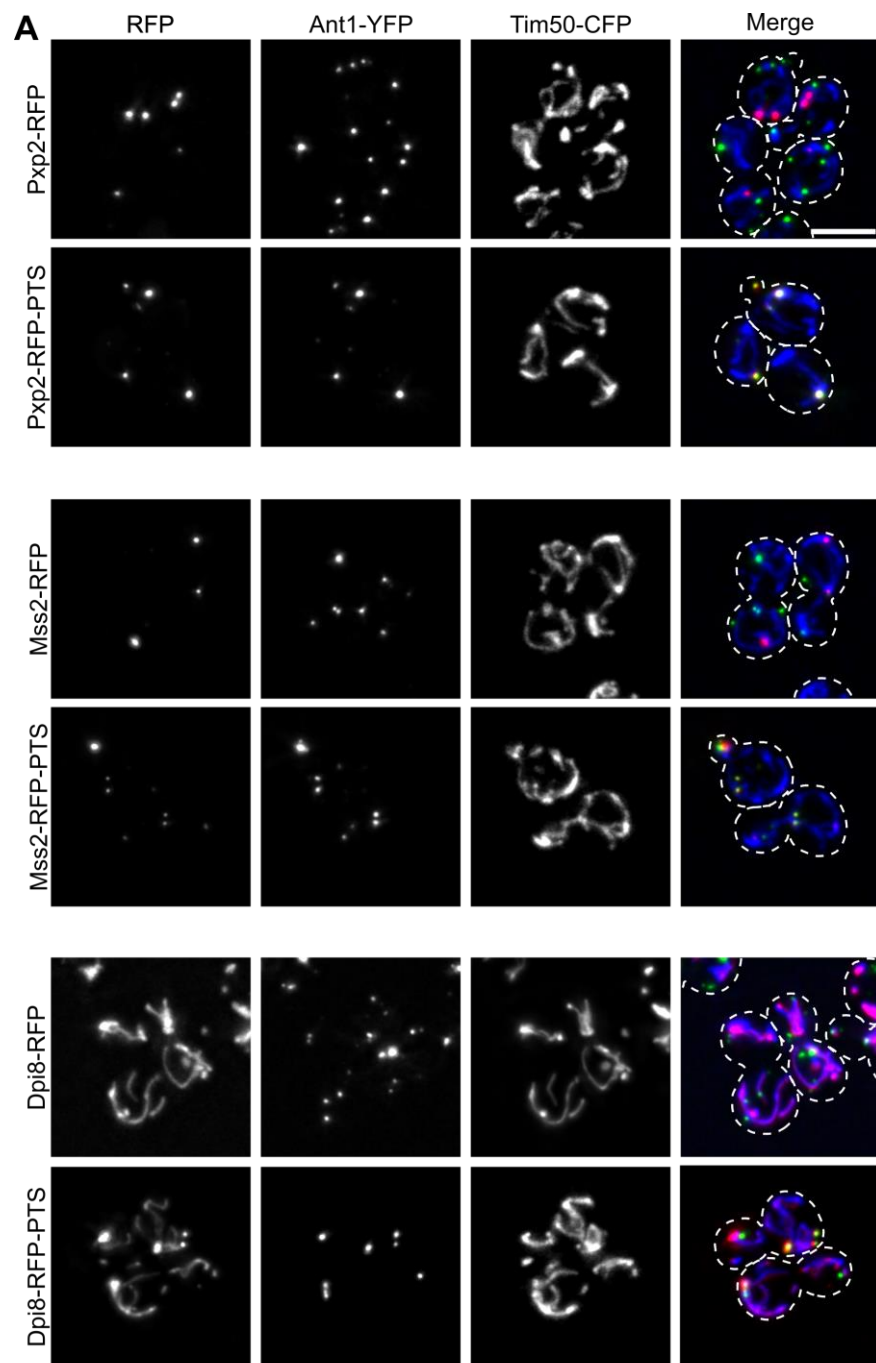


Abbildung 16. Lokalisierung mitochondrieller Proteine mit PTS1-Motiv. A. Pxp2, Mss2, Rml2 und Dpi8 wurden C-terminal mit RFP oder mit RFP gefolgt von dem PTS1 des jeweiligen Proteins markiert. Die Lokalisierung der Fusionsproteine wurde in Zellen, welche ebenfalls Ant1-YFP und Tim50-CFP exprimierten, fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zellumrisse sind als gestrichelte Linien dargestellt. Der Größenstandard entspricht 5 μm . B. Boxplot der Korrelationskoeffizienten des RFP- und YFP-Kanals der in A. gezeigten Stämme. Je Stamm wurden 15 Bilder ausgewertet.

Die duale Lokalisierung von Cat2 basiert auf der Expression von zwei Isoformen mit unterschiedlichen Zielsteuerungs-Sequenzen (Elgersma *et al*, 1995). Die Verteilung von Cta1 wird durch die verfügbare Kohlenstoffquelle reguliert (Petrova *et al*, 2004). Die mitochondrielle Lokalisierung von Cit2, Tes1 und Pxp2 wurde bisher in Hochdurchsatz-Studien, nicht aber in Einzelprotein-Studien nachgewiesen. Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisierung wurden daher neben Pxp2 und Dpi8 die *bona fide* mitochondriellen Proteine Mss2 und Rml2 ausgewählt. Pxp2 ist ein peroxisomales Protein mit unbekannter Funktion. Die Deletion von *pxp2* führt zu einem Wachstumsdefekt auf Medium mit Ölsäure oder Ethanol als einzige Kohlenstoffquelle (Nötzel *et al*, 2016). Die Funktion von Dpi8 ist ebenfalls unbekannt. Mss2 ist mit der zur mitochondriellen Matrix exponierten Seite der inneren Membran assoziiert. Es ist an der Insertion von Cox2, einer Untereinheit der Cytochrom c Oxidase, in die innere Membran beteiligt (Broadley *et al*, 2001). Rml2 ist eine Komponente der großen Untereinheit des mitochondriellen Ribosoms (Pan & Mason, 1997). Interessanterweise verhindert ein mutiertes Allel von Rml2 die Verstoffwechselung von Ölsäure (Trotter *et al*, 1999).

Pxp2, Mss2 und Dpi8 wurden C-terminal mit RFP oder RFP gefolgt von dem PTS1 des jeweiligen Proteins markiert und gemeinsam mit dem peroxisomalen Marker Ant1-YFP und dem mitochondriellen Marker Tim50-CFP exprimiert (Abbildung 16A). Beide Fusionsproteine von Pxp2 und Mss2 lokalisierten in Foci, die mit dem mitochondriellen Netzwerk überlappten. Pxp2-RFP-PTS und Mss2-RFP-PTS akkumulierten darüber hinaus teilweise in Peroxisomen. Dpi8-RFP war gleichmäßig über das mitochondrielle Netzwerk verteilt. Das Fusionsprotein mit PTS1 lokalisierte sowohl im mitochondriellen Netzwerk als auch in Peroxisomen. Überraschenderweise lokalisierte Dpi8-RFP-PTS in einigen Zellen nahezu vollständig in Mitochondrien, während das Fusionsprotein in anderen Zellen eine ausgeprägte peroxisomale Lokalisierung aufwies (Abbildung 17C). Die verstärkte Ko-Lokalisierung von Pxp2-RFP-PTS, Mss2 -RFP-PTS und Dpi8-RFP-PTS mit Peroxisomen im Vergleich zu den entsprechenden Fusionsproteinen ohne PTS1-Motiv wurde durch eine Quantifizierung der jeweiligen Korrelationskoeffizienten des RFP- und YFP-Kanals bestätigt (Abbildung 16B) Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass neben Ptc5 noch weitere Proteine durch molekulares Tauziehen zwischen Mitochondrien und Peroxisomen verteilt werden.

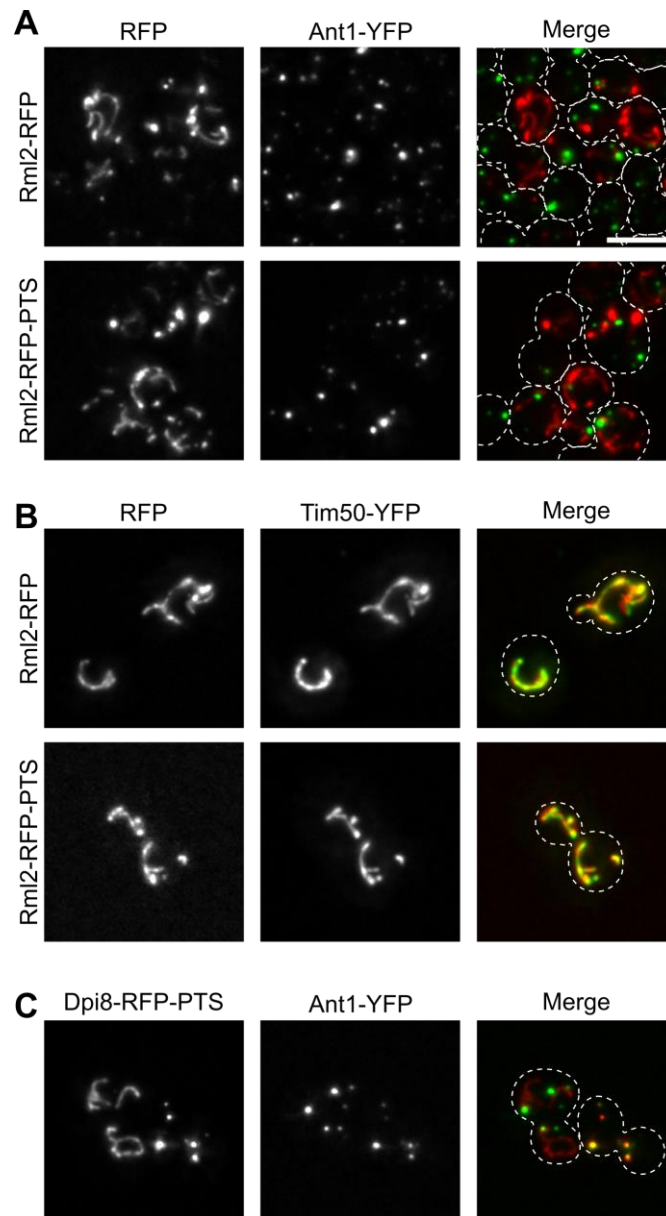


Abbildung 17. Subzelluläre Lokalisierung von Rml2 und Dpi8. **A.** C-terminale RFP-Fusionen Rml2 mit und ohne PTS1 wurden in Zellen, welche ebenfalls das peroxisomale Markerprotein Ant1-YFP exprimierten, fluoreszenzmikroskopisch untersucht. **B.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellen, die Rml2-RFP oder Rml2-RFP-PTS und das mitochondrielle Markerprotein Tim50-YFP ko-exprimierten. **C.** Zellen, die Dpi8-RFP-PTS und Ant1-YFP exprimierten, wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zellumrisse sind als gestrichelte Linien dargestellt. Der Größenstandard entspricht 5 μm .

2.4 Untersuchung der Proteinphosphatase Ptc5 in *U. maydis*

Parallel zu den Untersuchungen von Ptc5 in *S. cerevisiae* wurde das homologe Protein auch in *U. maydis* analysiert. *U. maydis* ist ein phytopathogener Basidiomycet, dessen saprophytische Sporidien sich im Labor ähnlich kultivieren lassen wie die Beckerhefe. Die Zellen des Pilzes weisen eine zigarrenförmige Morphologie auf und teilen sich durch Knospung. Für die Bearbeitung genetischer Fragestellungen steht eine Reihe molekularbiologischer Methoden, wie beispielsweise frei replizierende und integrative Plasmide, zur Verfügung (Kojic & Holloman, 2000). Durch die annotierte Genomsequenz sind gezielte genetische Manipulationen möglich (Kämper *et al*, 2006).

2.4.1 UmPtc5 erzeugt Kontakte zwischen Mitochondrien und Peroxisomen

Die beiden Zielsteuerungs-Signale von UmPtc5 wurden zunächst unabhängig voneinander *in vivo* auf ihre Funktionalität hin untersucht. Für die Überprüfung der Funktionalität des PTS1-Motivs wurden die letzten 36 Nukleotide von *umptc5* und das Stopcodon hinter den offenen Leserahmen von GFP in einen Vektor inseriert, der die konstitutive Expression von GFP unter Kontrolle des *otef* Promotors vermittelt (Spellig *et al*, 1996). Dieses Konstrukt wurde in den *ip* Locus des Wildtypstamms Bub8 integriert und auf die Expression des Fusionsproteins hin untersucht (Schulz *et al*, 1990). Der *ip* Locus (*iron-sulfur protein*; *sdh2*, *um00844*) erlaubt eine ortsspezifische Integration von DNA-Fragmenten. Dabei wird ein mutiertes *sdh2* Allel eingeführt, dessen Genprodukt dem Pilz eine Resistenz gegen das Fungizid Carboxin vermittelt (Broomfield & Hargreaves, 1992).

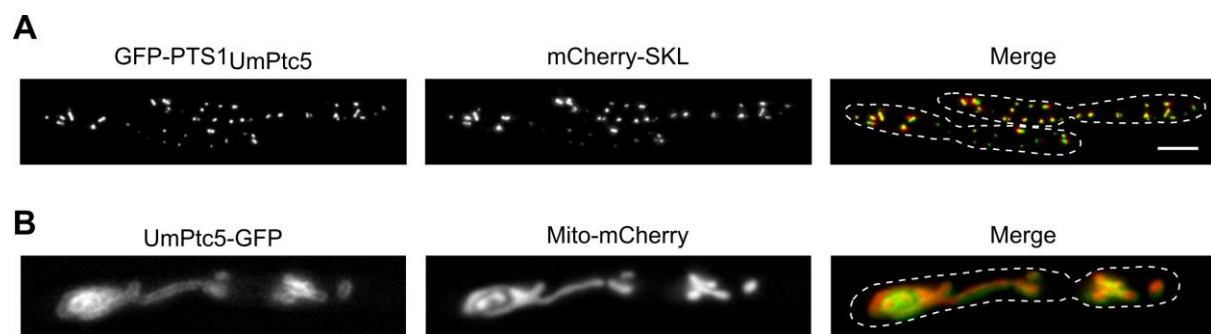


Abbildung 18: UmPtc5 besitzt Zielsteuerungs-Signale für Mitochondrien und Peroxisomen. **A.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer *U. maydis* Zelle, die GFP-PTS1_{UmPtc5} und das peroxisomale Markerprotein mCherry-SKL exprimierte. Der Größenstandard entspricht 5 μ m. Die Zellumrisse sind als gestrichelte Linien dargestellt. **B.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer *U. maydis* Zelle, die eine C-terminale GFP-Fusion von UmPtc5 und das mitochondrielle Reporter-Protein Mito-mCherry ko-exprimierte. Der Maßstab und die Darstellung entsprechen dem in A. gezeigten Bild.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass sich das Fusionsprotein GFP-PTS1_{UmPtc5} in punktförmigen Strukturen befand, in denen auch das peroxisomale Markerprotein mCherry-SKL akkumulierte (Abbildung 18A; Freitag *et al.*, 2012). Der C-Terminus von UmPtc5 enthält demnach ein funktionelles PTS1-Motiv. Die Überprüfung der N-terminalen Presequenz erfolgte durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen einer C-terminalen GFP-Fusion von UmPtc5. Die Funktionalität des PTS1 geht durch diese Fusion verloren, da das Motiv von GFP maskiert wird. UmPtc5-GFP wurde in tubulären Strukturen detektiert, in denen auch das mitochondrielle Markerprotein Mito-mCherry akkumulierte (Abbildung 18B). Mito-mCherry ist ein etablierter Reporter für die Visualisierung von Mitochondrien in *U. maydis*. Der Reporter besteht aus einer N-terminalen Presequenz des mitochondrialen Matrixproteins Mrb1 (Um06182) fusioniert an mCherry (Bortfeld *et al.*, 2004). Eine N-terminale GFP-Fusion von UmPtc5 lokalisierte nicht in Mitochondrien (Daten nicht gezeigt). Insgesamt zeigen diese Daten, dass UmPtc5 zwei unterschiedliche funktionelle Zielsteuerungssequenzen enthält.

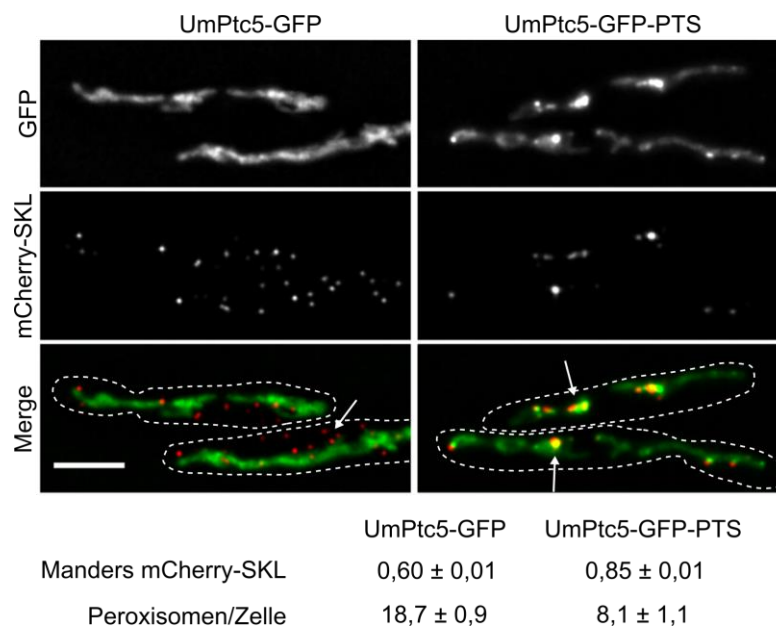


Abbildung 19: UmPtc5 vermittelt räumliche Nähe zwischen Peroxisomen und Mitochondrien. Endogenes UmPtc5 wurde am C-Terminus entweder mit GFP (links) oder mit GFP gefolgt von dem PTS1-Motiv von UmPtc5 (rechts) markiert. Gezeigt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen, welche das jeweilige Fusionsprotein und mCherry-SKL ko-exprimierten. Die Zellumrisse sind als gestrichelte Linien dargestellt. Der Größenstandard entspricht 5 μ m. Die Überlappung des roten Kanals mit dem grünen Kanal wurde mit dem Manders Teil-Koeffizienten von mCherry-SKL quantifiziert. Die Anzahl an Peroxisomen je Zelle wurde mit ImageJ ermittelt.

Anschließend stellte sich die Frage nach der subzellulären Lokalisierung von UmPtc5 wenn beide Signale intakt sind. Daher wurde die chromosomale Kopie von UmPtc5 genetisch so verändert, dass am C-Terminus eine translationelle Fusion mit GFP (UmPtc5-GFP) oder mit GFP gefolgt vom PTS1-Motiv von UmPtc5 (UmPtc5-GFP-PTS) entsteht. Die Untersuchung

des endogenen Proteins bot zwei Vorteile gegenüber der Analyse von Überexpressions-Stämmen mit einer Integration im *ip* Locus: Erstens lag nur das genetisch veränderte Allel in der Zelle vor. Dies schließt Interaktionen zwischen dem nativen und einem zusätzlich eingebrachten Protein aus. Außerdem können so experimentelle Artefakte aufgrund einer veränderten Expressionsstärke ausgeschlossen werden. Endogen markiertes UmPtc5-GFP konnte mit Fluoreszenzmikroskopie in Mitochondrien detektiert werden. Das GFP-Signal war einheitlich über das gesamte mitochondrielle Netzwerk verteilt. Peroxisomen waren gleichmäßig innerhalb der Zellen verteilt (Abbildung 19A). UmPtc5-GFP-PTS akkumulierte ebenfalls in Mitochondrien. Das Fusionsprotein war außerdem in punktförmigen Strukturen mit hoher Signalintensität innerhalb des mitochondriellen Netzwerks zu sehen. Die Verteilung der Peroxisomen war ungleichmäßig und die meisten Peroxisomen lokalisierten in unmittelbarer Nähe zu den punktförmigen Strukturen von UmPtc5-GFP-PTS. In einigen Fällen wurden zudem Aggregate von Peroxisomen an den Foci beobachtet. Die Anzahl an Peroxisomen war im Vergleich zu Stämmen mit UmPtc5-GFP verringert. In der Nähe besonders heller Foci konnten häufig vergrößerte Peroxisomen beobachtet werden. Der Grad an Ko-Lokalisierung zwischen den UmPtc5-Fusionen und mCherry-SKL wurde mit dem Manders Teil-Koeffizient von mCherry-SKL untersucht. Die Analyse zeigte eine Zunahme der Überlappung von UmPtc5-GFP-PTS mit mCherry-SKL im Vergleich zu UmPtc5-GFP mit mCherry-SKL. Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass in *U. maydis* häufig Peroxisomen in der Nähe von Mitochondrien lokalisieren. Diese Koinzidenz wird durch die Expression von UmPtc5-GFP-PTS1 verstärkt. Daher bilden sich bedingt durch die Expression dieses Fusionsproteins vermutlich zusätzliche Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und Peroxisomen. Eine Quantifizierung der Peroxisomen mit ImageJ ergab, dass die Expression von UmPtc5-GFP-PTS die Anzahl von Peroxisomen pro Zelle deutlich reduziert. Zusammen mit der Beobachtung vergrößerter Peroxisomen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die zusätzliche Verankerung von Peroxisomen an den Mitochondrien durch UmPtc5 die Teilung von Peroxisomen reduzieren könnte.

Da ein funktionelles PTS1-Motiv für die Bildung der beobachteten Kontakte erforderlich war, wurde untersucht, ob der peroxisomale Importrezeptor Pex5 für diesen Mechanismus benötigt wird. Das Genom von *U. maydis* kodiert für zwei PTS1-Rezeptoren, Pex5a und Pex5b. Pex5b ist für den Import sämtlicher Matrixproteine erforderlich (Ast, 2017). Die Funktion von Pex5b für die UmPtc5-vermittelte Verankerung der beiden Zellorganellen wurde durch die Expression von UmPtc5-GFP-PTS im Wildtyp und in einer *pex5b* Deletionsmutante untersucht. Die Visualisierung von Peroxisomen erfolgte durch die ektopische Expression des peroxisomalen

Membranprotein Pex12 fusioniert mit mCherry (Pex12-mCherry; Julia Ast, persönliche Mitteilung). UmPtc5-GFP-PTS stand unter der Kontrolle des *otef* Promotors und das entsprechende Konstrukt war im *ip* Locus des jeweiligen Stamms integriert. Das Fusionsprotein lokalisierte sowohl im WT als auch in $\Delta pex5b$ Zellen in Mitochondrien (Abbildung 20). Im WT akkumulierte UmPtc5-GFP-PTS zusätzlich in hellen Foci, welche von Peroxisomen umgeben waren. Diese Foci waren in $\Delta pex5b$ Zellen äußerst selten zu sehen und hatten meist keinen Kontakt zu den Peroxisomen. Diese Daten zeigen, dass der Importrezeptor Pex5b für den UmPtc5-vermittelten Kontakt zwischen Mitochondrien und Peroxisomen notwendig ist.

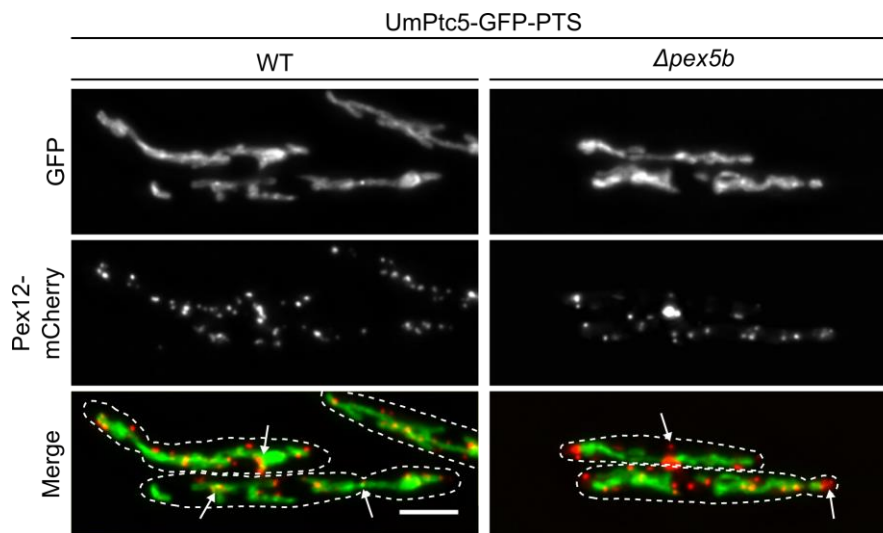


Abbildung 20: UmPtc5-vermittelter Kontakt zwischen Mitochondrien und Peroxisomen hängt vom PTS1-Importrezeptor Pex5b ab. Mikroskopische Aufnahmen von WT und $\Delta pex5$ Zellen, welche UmPtc5-GFP-PTS und den peroxisomalen Marker Pex12-mCherry ko-exprimierten. Die gestrichelten Linien geben die Zellumrisse wieder. Der Größenmaßstab entspricht 5 μ m.

2.4.2 Ein synthetischer Protein-Anker erzeugt PTS1-vermittelte Kontakte zwischen dem ER und Peroxisomen

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von UmPtc5-GFP-PTS deuteten darauf hin, dass ein möglicherweise membranständiges Protein mit PTS1-Signal in *U. maydis* Kontakte zwischen Mitochondrien und Peroxisomen erzeugen kann. Daher wurde ebenfalls ein synthetischer Proteinanker erzeugt, indem GFP gefolgt von dem PTS1-Signal von UmPtc5 an das hochkonservierte Membranprotein Sec63 (Um06175) angehängt wurde. Als Kontrolle diente ein Fusionsprotein ohne PTS1 (Sec63-GFP). Sec63 von *S. cerevisiae* enthält drei Transmembrandomänen und der C-Terminus zeigt ins Cytosol (Feldheim *et al.*, 1992). Eine Vorhersage für das *U. maydis* Homolog mit dem Programm TMHMM prognostizierte eine identische Membran-Topologie. Daher zeigt das PTS1 von Sec63-GFP-PTS vermutlich ebenfalls ins Cytosol und könnte von Pex5 gebunden werden.

Der offene Leserahmen von Sec63-GFP-PTS und Sec-GFP wurden stromabwärts des *otef* Promotors in einen Vektor inseriert und in den *ip*-Lokus von Bub8 mCherry-SKL integriert. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass sowohl Sec63-GFP als auch Sec63-GFP-PTS im kortikalen sowie im perinukleären ER lokalisierten (Abbildung 21A).

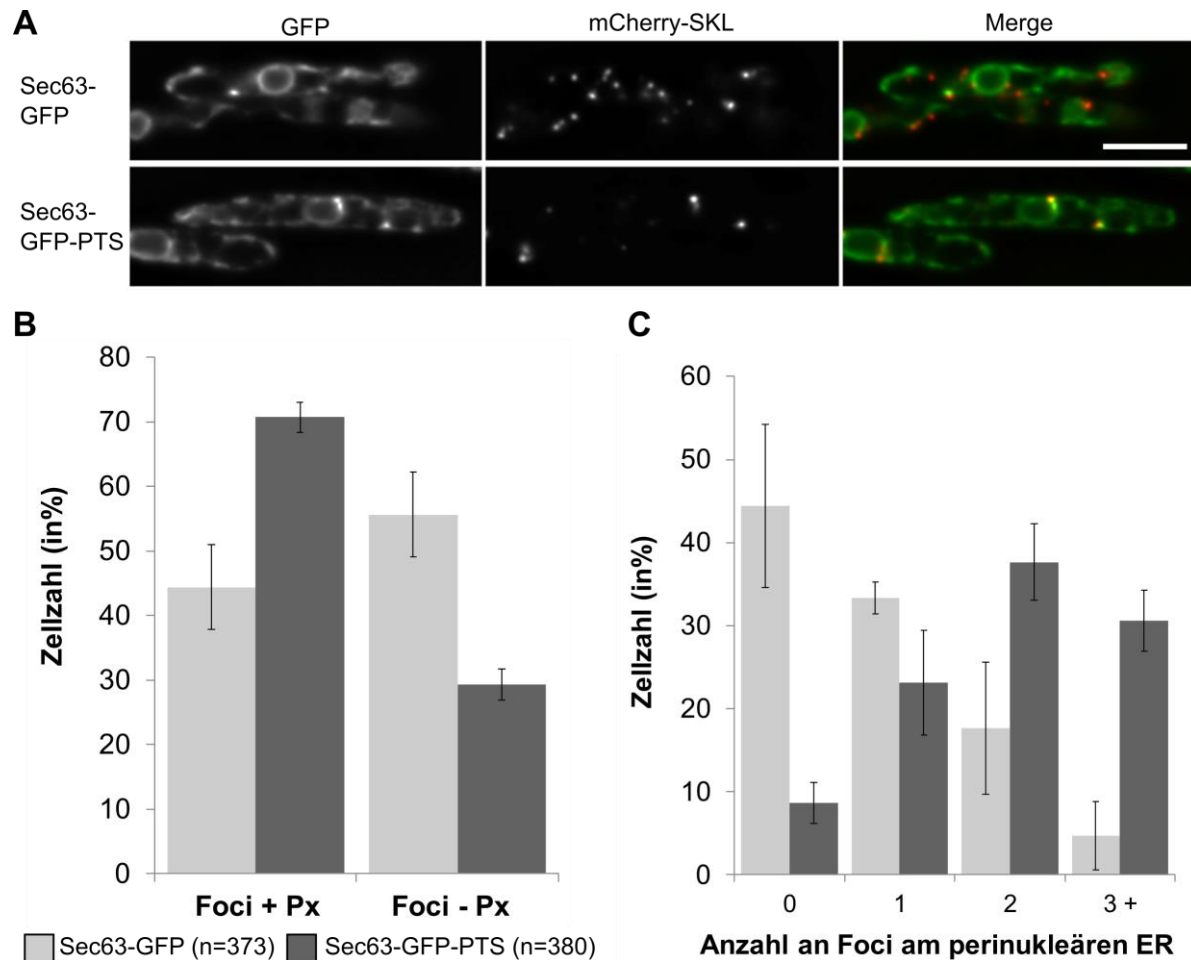


Abbildung 21: Der synthetische Proteinanker Sec63-GFP-PTS erzeugt Peroxisomen-ER Kontakte. A. Das ER-ständige Membranprotein Sec63 (Um06175) wurde C-terminal mit GFP (Sec63-GFP) oder mit GFP gefolgt von dem PTS1 von UmPtc5 (Sec63-GFP-PTS) markiert. Gezeigt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *U. maydis* Zellen, welche die genannten Konstrukte gemeinsam mit dem peroxisomalen Marker mCherry-SKL ko-exprimierten. Der Größenstandard entspricht 5 µm. B. Quantifizierung der Anzahl GFP-positiver Foci mit (Foci + Px) und ohne (Foci - Px) räumliche Nähe zu Peroxisomen der in A. gezeigten Stämme. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten an. C. Quantifizierung der Anzahl GFP-positiver Foci am perinukleären ER der in A. gezeigten Stämme. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten an.

Sec63-GFP-PTS akkumulierte zusätzlich in hellen, punktförmigen Strukturen innerhalb des ER, welche häufig mit mCherry-SKL ko-lokalisierten. Ähnliche Foci wurden für Sec63-GFP selten beobachtet und sie lokalisierten meist im peripheren ER. Eine quantitative Auswertung der Mikroskopie-Daten zeigte, dass ca. 45% der fokalen Strukturen von Sec63-GFP mit Peroxisomen ko-lokalisierten (Abbildung 21B). Die Foci von Sec63-GFP-PTS überlagerten dagegen in 70% aller Fälle mit den Peroxisomen. Die Anzahl fokaler Strukturen am

perinukleären ER war in Sec63-GFP-PTS im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls stark erhöht (Abbildung 21C). Die Verteilung und Anzahl der Peroxisomen waren im Kontroll-Stamm wildtypisch, während die Expression von Sec63-GFP-PTS zu einer reduzierten Menge von Peroxisomen führte ($19,9 \pm 1,9$ bzw. $13,6 \pm 0,46$ Peroxisomen/ Zelle). Zudem waren die Peroxisomen in Anwesenheit von Sec63-GFP-PTS ungleichmäßig in den Zellen verteilt und wirkten zum Teil vergrößert. Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass das Anfügen eines PTS1-Signals an das ER-Membranprotein Sec63 einen synthetischen Proteinanker generiert. Der Proteinanker erzeugt artifizielle Kontakte zwischen dem ER und den Peroxisomen. Die Verankerung führt ähnlich wie die Expression von UmPtc5-GFP-PTS zu einer Beeinträchtigung der peroxisomalen Proliferation. Membranproteine mit PTS1 können demnach auch in *U. maydis* zwischen Peroxisomen und anderen Zellorganellen Kontakte erzeugen.

3 Diskussion

In den Untersuchungen zu dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die Protein-Phosphatase Ptc5 aus *S. cerevisiae* eine duale Lokalisierung in Mitochondrien und Peroxisomen aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Spaltung von Ptc5 durch den mitochondriellen IMP-Komplex notwendig für die Translokation der Phosphatase von Mitochondrien in die Peroxisomen ist. Die genauere Charakterisierung des intrazellulären Transports von Ptc5 zeigte, dass die duale Lokalisierung des Proteins durch ein molekulares Tauziehen zwischen der peroxisomalen und der mitochondriellen Import-Maschinerie zustande kommt. Durch diesen Tauzieh-Mechanismus kann ebenfalls Kontakt zwischen Mitochondrien und Peroxisomen erzeugt werden, sofern Ptc5 in die mitochondrielle Matrix gelenkt wird. Eine duale Lokalisierung in Mitochondrien und Peroxisomen wurde auch für weitere mitochondrielle Proteine mit PTS1-Motiv beobachtet. Darüber hinaus konnte sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *U. maydis* gezeigt werden, dass Kontakte zwischen dem ER und Peroxisomen durch einen synthetischen Proteinanker erzeugt werden können. Schließlich wurde festgestellt, dass der indirekte Import von Ptc5 über Mitochondrien in Peroxisomen schädliche Phosphatase-Aktivität im Cytosol verhindert.

3.1 Die biologische Funktion von Ptc5

Vor Beginn dieser Arbeit wurde Ptc5 in zwei Publikationen als eine von zwei Phosphatasen beschrieben, welche die Aktivität von Pda1, der E1 α Untereinheit des mitochondrialen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes, positiv regulieren (Krause-Buchholz *et al.*, 2006; Gey *et al.*, 2008). Einige Jahre später wurde durch eine Proteom-Studie festgestellt, dass Ptc5 im IMS lokalisiert (Vögtle *et al.*, 2012). Diese Lokalisierung spricht gegen eine Funktion von Ptc5 als Phosphatase von Pda1, da sich die Pyruvat-Dehydrogenase in der mitochondrialen Matrix befindet (Nuebel *et al.*, 2016). Eine physikalische Interaktion der beiden Proteine sollte daher durch die innere mitochondriale Membran verhindert werden. Vor zwei Jahren wurde durch eine Phosphoproteom-Analyse und biochemische Experimente gezeigt, dass Ptc6 die Dephosphorylierung von Pda1 katalysiert (Guo *et al.*, 2017). Die von Krause-Buchholz *et al.* und Gey *et al.* beschriebene reduzierte Aktivität von Pda1 in Abwesenheit von Ptc5 ist daher vermutlich auf sekundäre Effekte zurückzuführen. Guo *et al.* zeigten ferner, dass in einer *ptc5* Deletionsmutante mehrere Phosphopeptide der Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase Gpd1 im

Vergleich zum Wildtyp angereichert sind. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die peroxisomale Fraktion von Gpd1 durch Ptc5 de-phosphoryliert werden kann (Abbildung 14). Gpd1 lokalisiert im Cytosol und in Peroxisomen, in die es durch ein PTS2-Signal in der Nähe des N-Terminus importiert wird (Jung *et al*, 2010). Dort ist das Enzym gemeinsam mit der Malat-Dehydrogenase Mdh3 an der Regeneration von NAD beteiligt, das während der Oxidation von Fettsäuren verbraucht wird (Al-Saryi *et al*, 2017). Die Aktivität und die subzelluläre Lokalisierung von Gpd1 werden durch die Phosphorylierung von Serin-Resten in der Nähe des PTS2 reguliert (Jung *et al*, 2010; Lee *et al*, 2012). Die enzymatische Aktivität wird durch die Phosphorylierung gesenkt, wohingegen die Effizienz des peroxisomalen Imports gesteigert wird. In Glukose-haltigem Medium wird ein Großteil von Gpd1 durch die cytosolischen Kinasen Ypk1 und Ypk2 phosphoryliert (Lee *et al*, 2012). Die damit einhergehende Reduktion der Enzymaktivität könnte durch die Ptc5-vermittelte Dephosphorylierung von Gpd1 in der peroxisomalen Matrix kompensiert werden. Dies könnte insbesondere unter Bedingungen vorteilhaft sein, die zu einer hohen Rate peroxisomaler β -Oxidation führen. Eine Funktion von Ptc5 während des Wachstums auf Ölsäure als alleinige Kohlenstoffquelle konnte durch Tropftests bisher nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist der Effekt der Feinabstimmung von Gpd1 durch Ptc5 zu gering, um durch einen Wachstumstest auf Festmedien beobachtet zu werden. Ein schwacher Wachstumsdefekt von *ptc5* Deletionsmutanten könnte möglicherweise durch zusätzlichen Stress während des Wachstums auf Ölsäure, beispielsweise durch die Zugabe von Natriumchlorid, detektiert werden (Jung *et al*, 2010). Darüber hinaus könnten weitere peroxisomale Substrate von Ptc5 durch eine Phosphoproteom-Analyse aus isolierten Peroxisomen aus WT und *Aptc5* Zellen gesucht werden.

3.2 Eine neue Membrankontaktstelle zwischen Peroxisomen und Mitochondrien durch molekulares Tauziehen?

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die duale Lokalisierung von Ptc5 in Mitochondrien und Peroxisomen durch den gleichzeitigen Import des Proteins in die beiden Organellen entsteht (Abbildung 10, Abbildung 11A und Abbildung 12). In *U. maydis* lokalisierte UmPtc5-GFP-PTS größtenteils in Mitochondrien und erzeugte enge räumliche Nähe zwischen Mitochondrien und Peroxisomen. Die Expression des Fusionsproteins führte zur Bildung von Peroxisomen-Aggregaten in unmittelbarer Nähe von Mitochondrien und zu einer reduzierten Anzahl an Peroxisomen (Abbildung 19). Diese unterschiedlichen Ergebnisse für Ptc5 und UmPtc5

könnten auf die Verwendung der verschiedenen Fluorophore oder unterschiedliche Expressionsniveaus zurückgeführt werden. Für tagRFP, das für die Untersuchung von Ptc5 genutzt wurde, beträgt die Zeitspanne zwischen der Synthese des Proteins bis zur Reifung der Hälfte aller Moleküle (*maturation half-time*) ca. 100 Minuten (Merzlyak *et al*, 2007). Das für die Charakterisierung von UmPtc5 genutzte eGFP besitzt hingegen eine *maturation half-time* von 25 Minuten (Cormack *et al*, 1996). tagRFP und eGFP unterscheiden sich möglicherweise ebenfalls in der Dauer der Proteinfaltung und dem Hang zur Bildung von Proteinaggregaten. Die schnelle Faltung von eGFP oder die Bildung von eGFP-Aggregaten während des mitochondrialen Imports von UmPtc5-GFP-PTS könnte möglicherweise dazu führen, dass das Fusionsprotein in der mitochondrialen Importpore der äußeren Membran hängen bleibt. Die mögliche Blockade der Spaltung von UmPtc5 durch GFP wäre eine weitere Erklärung für die Unterschiede in der Lokalisierung zwischen UmPtc5-GFP-PTS und Ptc5-RFP-PTS. Für einige Proteinfusionen in *S. cerevisiae* wurden jedoch auch Beobachtungen gemacht, die der Lokalisierung des zuvor diskutierten UmPtc5-GFP-PTS aus *U. maydis* ähneln.

Die Expression von Ptc5^{ΔTM}-RFP-PTS, das unabhängig vom IMP-Komplex in die mitochondrielle Matrix gelenkt wird, erzeugte stabile Kontakte zwischen Mitochondrien und Peroxisomen (Abbildung 11C, D und E). Dies trifft womöglich in ähnlicher Weise für die Expression von Ptc5-RFP-PTS und die Expression der Fusionsproteine mit PTS1 von Pxp2, Mss2 und Dpi8 zu. Zur Untersuchung dieser Hypothese wird die in Abbildung 11E gezeigte Quantifizierung derzeit für die entsprechenden Stämme durchgeführt. Ptc5-RFP-PTS lokalisierte zu einem großen Teil in Peroxisomen, während Ptc5^{ΔTM}-RFP-PTS verstärkt in Mitochondrien detektiert wurde (Abbildung 3A und Abbildung 11C). Die unterschiedliche Lokalisierung kann als Hinweis dafür gelten, dass die Prozessierung von Ptc5-RFP-PTS durch den IMP-Komplex das molekulare Tauziehen zwischen den beiden Importkomplexen beendet und daher nur kurzlebige Kontakte zwischen den beiden Organellen entstehen. Im Gegensatz dazu wird Ptc5^{ΔTM}-RFP-PTS wahrscheinlich permanent durch den Presequenz-Translokase assoziierten Motor in die mitochondrielle Matrix gezogen (Kang *et al*, 1990; Schneider *et al*, 1994; Ungermann *et al*, 1994). Da das Protein gleichzeitig durch die peroxisomale Importmaschinerie in die entgegengesetzte Richtung gezogen wird, verbleibt es womöglich länger im Zustand des Tauziehens und vermittelt dadurch längerfristige Kontakte zwischen Mitochondrien und Peroxisomen. Ein indirektes Maß für die Dauer dieser Kontakte ist beispielsweise die Geschwindigkeit von Peroxisomen, die mittels Zeitraffer-Mikroskopie ermittelt werden könnte (Shai *et al*, 2018).

Die Fusion eines fluoreszierenden Proteins gefolgt von einem PTS1 an den C-Terminus des ER-ständigen Membranproteins Sec63 erzeugte einen synthetischen Proteinanker, welcher sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *U. maydis* Kontakte zwischen dem ER und Peroxisomen vermittelte (Abbildung 13 und Abbildung 21). In diesem Fall entsteht der Kontakt nicht durch molekulares Tauziehen, sondern wahrscheinlich durch das Heranziehen von Peroxisomen ans ER infolge des partiellen Imports des membranständigen Proteinankers in die peroxisomale Matrix. In *U. maydis* führte die Expression des synthetischen Proteinankers zu einer reduzierten Teilungsrate der Peroxisomen. Die Verankerung zwischen dem ER und Peroxisomen ist möglicherweise so stark, dass sie die peroxisomale Teilungsmaschinerie behindert.

Der in dieser Arbeit beschriebene molekulare Tauzieh-Mechanismus dient möglicherweise neben der Verteilung von Proteinen auch der Erzeugung einer neuen Membrankontaktstelle zwischen Mitochondrien und Peroxisomen. Membrankontaktstellen sind Bereiche zwischen zwei Organellen, in denen die sich gegenüberliegenden Membranen enge räumliche Nähe zueinander haben. Über diese Festlegung hinaus existiert in der Literatur bisher keine einheitliche Definition dieser Strukturen (Eisenberg-Bord *et al.*, 2016; Scorrano *et al.*, 2019). Die Distanz zwischen den beiden Membranen wird häufig als ein weiteres Kriterium herangezogen. Eisenberg-Bord *et al.* geben einen Wert von 30 nm als mittlere Distanz an, während Scorrano *et al.* ein Intervall von 10 bis 80 nm nennen und darauf verweisen, dass der Proteinanker Num1 von *S. cerevisiae* sogar eine Distanz von ca. 300 nm überbrücken kann (Ping *et al.*, 2016). Die Distanz der Membranen an möglichen Membrankontaktstellen zwischen Mitochondrien und Peroxisomen, die durch die Expression von Ptc5^{ΔTM}-RFP-PTS induziert werden, könnten durch elektronenmikroskopische Aufnahmen der entsprechenden Stämme genauer untersucht werden.

Ein weiteres Merkmal von Membrankontaktstellen sind Proteinanker, die die Kontaktstellen erzeugen und aufrechterhalten (Eisenberg-Bord *et al.*, 2016; Scorrano *et al.*, 2019). Eisenberg-Bord *et al.* beschreiben drei notwendige Eigenschaften dieser Proteine: (1) Sie lokalisieren ausschließlich oder verstärkt an der Kontaktstelle. (2) Sie müssen fähig sein die Membranen der Membrankontaktstellen zu binden. Viele Proteinanker besitzen in der Tat membranbindende Domänen, beispielsweise C2- oder PH-Domänen (Eisenberg-Bord *et al.*, 2016). Proteinanker können auch durch die Interaktion von zwei oder mehr Proteinen zustande kommen, wie im Falle des ERMES-Komplex (Kornmann *et al.*, 2009). (3) Proteinanker müssen Kraft auf die Membranen der Membrankontaktstellen ausüben (*tethering force*), um diese in Kontakt zu bringen oder den Kontakt aufrecht zu erhalten. In Pflanzen wurde der Kraftaufwand von Proteinankern direkt gemessen, indem die jeweiligen Membranen im Bereich der

Membrankontaktstellen durch optische Pinzetten auseinander gezogen wurden (Andersson *et al*, 2007; Gao *et al*, 2016). Eine Möglichkeit zur indirekten Messung des Kraftaufwands stellt die Komplementation von Deletionsmutanten der Proteinanker durch synthetische Konstrukte dar (Kornmann *et al*, 2009; Ping *et al*, 2016).

Die erste Eigenschaft wird von Ptc5^{ΔTM}-RFP-PTS, Pxp2-RFP-PTS und Mss2-RFP-PTS erfüllt, da sie in fokalen Strukturen akkumulierten, in deren unmittelbarer Nähe Mitochondrien und Peroxisomen in Kontakt zueinander standen (Abbildung 11 und Abbildung 16). Dpi8-RFP-PTS lokalisierte teilweise in ähnlichen Foci, allerdings war das Protein häufig auch gleichmäßig über das gesamte mitochondrielle Netzwerk verteilt. Die zweite Eigenschaft wird formal nicht erfüllt, da keines der vier Proteine laut bioinformatischen Vorhersagen membranbindende Domänen oder Transmembrandomänen besitzt (Daten nicht gezeigt). Die TMD von Ptc5 wird während der Reifung des Polypeptids entfernt (Abbildung 7A und B, Abbildung 9A, Vögtle *et al*, 2012). Während des molekularen Tauziehens weisen die Proteine aber möglicherweise temporär den Charakter eines membrangebundenen Proteins auf, da sie durch die beiden Importkomplexe fixiert werden. Sie erfüllen dadurch womöglich die zweite Voraussetzung auf einem anderen Weg. Da vermutlich beide Importmaschinen, teilweise unter ATP-Verbrauch, die Proteine in entgegengesetzte Richtung ziehen, wird die dritte Voraussetzung definitiv erfüllt. Die während des molekularen Tauziehens auftretende Kraft könnte möglicherweise durch den Einsatz optischer Pinzetten gemessen werden (Gao *et al*, 2016).

Eine spannende Frage ist, ob der Tauzieh-Mechanismus zusätzliche Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und Peroxisomen erzeugt oder bereits bestehende Kontaktstellen verstärkt. In Säugetierzellen stehen ca. 20% der Peroxisomen in Kontakt mit Mitochondrien (Valm *et al*, 2017), allerdings konnten bisher keine Proteinanker für diese Kontaktstelle in höheren Eukaryonten eindeutig identifiziert werden. In Leydig-Zellen wurde beobachtet, dass die Expression von ACBD2/ECI2 Isoform A zu Interaktionen zwischen Mitochondrien und Peroxisomen führt (Fan *et al*, 2016). ECI2 ist eine Enoyl-CoA Isomerase, welche an der β -Oxidation ungesättigter Fettsäuren beteiligt ist (Van Weeghel *et al*, 2014). Interessanterweise besitzt die Isoform eine mitochondrielle Presequenz und ein PTS1. Die Domänenstruktur des Proteins ist daher vergleichbar mit der Domänenstruktur von Ptc5, Pxp2, Mss2 und Dpi8. Der molekulare Mechanismus der ECI2-vermittelten Interaktionen konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Möglicherweise basiert er ebenfalls auf molekularem Tauziehen.

In *S. cerevisiae* wurde der Protein-Komplex aus der ERMES-Untereinheit Mdm34 und dem Peroxin Pex11 als eine Determinante von Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und Peroxisomen identifiziert (Mattiuzzi Ušaj *et al*, 2015). In einer *pex11* Deletionsmutante ko-

lokalisiert Pex14 deutlich seltener mit Mdm34 als im Wildtyp. Eine andere Studie identifizierte das Peroxin Pex34 und das Mitofusin Fzo1 als Komponenten von Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und Peroxisomen (Shai *et al*, 2018). Die Überexpression von Pex34 oder Fzo1 bewirkte eine Zunahme der Kontaktfläche zwischen Peroxisomen und Mitochondrien und eine Abnahme der Bewegung der Peroxisomen. Der Kontakt zwischen Mitochondrien und Peroxisomen ist in einer *fzo1/pex34/pex11* Dreifachmutante nicht reduziert, was für die Existenz weiterer Proteinanker spricht (Eisenberg-Bord *et al*, 2016; Shai *et al*, 2018). Ähnliche Erkenntnisse wurden für die Kontaktstellen zwischen dem ER und der Plasmamembran gewonnen (Manford *et al*, 2012). Der in dieser Arbeit vorgeschlagene Mechanismus des molekularen Tauziehens bietet eine plausible Erklärung für die hohe Redundanz. Zur Überprüfung dieser Hypothese könnten die kodierenden Sequenzen der PTS1 Signale von Ptc5, Pxp2, Mss2 und Dpi8 deletiert werden. Die resultierenden Zellen könnten anschließend fluoreszenz- und elektronenmikroskopisch untersucht werden, um den Einfluss des molekularen Tauziehens auf den Kontakt zwischen Peroxisomen und Mitochondrien zu untersuchen. Diese Untersuchung wird jedoch dadurch erschwert, dass ungefähr 20 weitere Proteine in *S. cerevisiae* eine Domänenstruktur aufweisen, die molekulares Tauziehen zwischen Peroxisomen und Mitochondrien erlauben könnte. Alternativ könnte der Kontakt zwischen den beiden Organellen in einer *pex5* Deletionsmutante untersucht werden, in der kein molekulares Tauziehen mehr möglich ist.

3.3 Die Translokation von Ptc5 in Mitochondrien und Peroxisomen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Ptc5 eine duale Lokalisierung in Mitochondrien und Peroxisomen aufweist (Abbildung 3). Die peroxisomale Lokalisierung der Phosphatase war abhängig von dessen PTS1 Signal (Abbildung 3A), dem Importrezeptor Pex5 (Abbildung 3C) sowie der peroxisomalen Importmaschinerie (Abbildung 4). Überraschenderweise war die proteolytische Spaltung durch den mitochondriellen IMP-Komplex eine entscheidende Voraussetzung für den Import von Ptc5 in Peroxisomen (Abbildung 6, Abbildung 7 und Abbildung 9)

In *S. cerevisiae* wurde für die mitochondriellen Proteine Aconitase (Aco1), Fumarase (Fum1) und Cystein-Desulfurase (Nfs1) gezeigt, dass ein Teil der Polypeptide nach der Prozessierung durch MPP in der mitochondriellen Matrix durch retrograde Bewegung ins Cytosol oder in den Zellkern transportiert werden (Stein *et al*, 1994; Regev-Rudzki *et al*, 2005; Naamati *et al*, 2009). Der retrograde Transport ins Cytosol und anschließende Import in Peroxisomen als

Ursache der peroxisomalen Lokalisierung von Ptc5 konnte jedoch durch folgende Beobachtungen ausgeschlossen werden: Ptc5-RFP akkumulierte im WT ausschließlich in Mitochondrien und auch das Fusionsprotein mit PTS1-Signal wurde in Abwesenheit von Pex5, Pex6 oder Pex14 nur in Mitochondrien beobachtet (Abbildung 3 und Abbildung 4). Eine Ptc5 Variante ohne Zielsteuerungs-Signale wurde aber stabil im Cytosol exprimiert (Abbildung 11A). Daher ist die Bindung von Pex5 während des mitochondrialen Imports von Ptc5 notwendig für die peroxisomale Lokalisierung der Phosphatase. Die Interaktion mit Pex5 ist jedoch nicht hinreichend für diesen Vorgang, da Ptc5 weder in *Δpex6* noch in *Δpex14* Zellen im Cytosol akkumulierte. Der erfolgreiche peroxisomale Import von Ptc5 hängt daher davon ab, dass der Pex5-Ptc5-Komplex bereits während des mitochondrialen Imports mit der peroxisomalen Importmaschinerie interagiert. Dieses molekulare Tauziehen zwischen den Import-Komplexen findet möglicherweise an Membrankontaktstellen zwischen Mitochondrien und Peroxisomen statt, damit die Import-Komplexe sich bereits vor dem Tauziehen in enger räumlicher Nähe zueinander befinden (Abbildung 10). Vorläufige Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Deletion von *mdm12* zu einer reduzierten Ko-Lokalisierung von Ptc5-RFP-PTS, Pxp2-RFP-PTS, Mss2-RFP-PTS und Dpi8-RFP-PTS mit Ant1-YFP führen. Mdm12 wird für die korrekte Lokalisierung von Mdm34 benötigt, das möglicherweise durch die Interaktion mit Pex11 eine Membrankontaktstelle zwischen Peroxisomen und Mitochondrien aufbaut (Kornmann *et al*, 2009; Mattiazzi Ušaj *et al*, 2015). Dieses Ergebnis kann daher als Hinweis dafür gelten, dass räumliche Nähe zwischen beiden Organellen förderlich für die Translokation durch molekulares Tauziehen ist.

Bei der Untersuchung der biologischen Relevanz dieses neuartigen Transportwegs wurde festgestellt, dass der indirekte Import von Ptc5 über Mitochondrien in Peroxisomen schädliche Phosphatase-Aktivität im Cytosol unterbindet (Abbildung 15). Im Gegensatz zum Import ungefalteter Proteine in Mitochondrien oder das ER, können peroxisomale Matrixproteine in vollständig gefaltetem und katalytisch aktivem Zustand ins peroxisomale Lumen transloziert werden (Zimmermann *et al*, 2011; Smith & Aitchison, 2013; Wiedemann & Pfanner, 2017). In der Literatur wird die Aufenthaltsdauer peroxisomaler Matrixproteine im Cytosol je nach Organismus, Versuchsaufbau und Protein zwischen 5 Minuten und mehreren Stunden angegeben (Goodman *et al*, 1984; McNew & Goodman, 1994; Stewart *et al*, 2001; Titorenko *et al*, 2002). Der indirekte Import von Ptc5 in Peroxisomen verhindert dessen schädliche Aktivität im Cytosol also vermutlich deshalb, weil das Protein zunächst ko-translationell in die Mitochondrien importiert wird, von dort direkt in die peroxisomale Matrix importiert wird und erst dort vollständig gefaltet wird (Changle *et al*, 2006; Bartoszewska *et al*, 2012).

4 Material und Methoden

4.1 Materialien mit Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden vornehmlich von Difco (Augsburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen und waren überwiegend von der Qualität p.a..

4.1.2 Antikörper und Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von Fermentas/Thermo Scientific (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (NEB; Frankfurt) bezogen. Zur Amplifikation von DNA wurden die Polymerasen Phusion Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes/NEB, Frankfurt) oder die KOD Extreme Polymerase (Novagen/Merck, Darmstadt) verwendet. Dephosphorylierung von DNA erfolgte mit der Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) von Fermentas/Thermo Scientific. Das Auffüllen von einzelsträngiger DNA wurde mit dem Klenow-Fragment (Thermo Scientific) durchgeführt. RNA bzw. DNA wurde mit der RNase A von AppliChem (Gatersleben) bzw. DNase I von NEB enzymatisch abgebaut. Der Ligation von DNA-Fragmenten diente die T4 DNA Ligase (Roche; Mannheim). Bakterielle Zellwände wurden mit Lysozym (Roche) degradiert. Für den Abbau der Zellwände von *U. maydis* wurden Lysing enzymes aus *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich) und für die Zellwände von *S. cerevisiae* wurde Lyticase (Sigma-Aldrich) eingesetzt.

4.1.3 Puffer und Lösungen

Für bestimmte Methoden direkt benötigte Puffer sind unter der Beschreibung der jeweiligen Methode aufgeführt. Andere verwendete Standardlösungen und Puffer wurden nach Ausubel *et al*, 1987 oder Sambrook *et al*, 1989 hergestellt. Wenn nötig wurden die verwendeten Lösungen und Puffer vor ihrer Verwendung für 20 min bei 121°C autoklaviert oder alternativ mit einem Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) von Sarstedt (Nümbrecht) sterilisiert.

4.1.4 Kits

Zur Präparation von Plasmiden in kleinem Maßstab wurde das ZR-Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Freiburg) verwendet. DNA aus Agarose Gelen wurde mit dem Gel/PCR Fragments Extraction Kit (Avegene, Hamburg) präpariert.

4.1.5 Geräte

Geräte, die direkt für bestimmte Methoden verwendet wurden, sind bei den jeweiligen Methoden aufgeführt. Der Zentrifugation von Reaktionsgefäßen (1,5 und 2 ml) diene eine Heraeus Biofuge pico und der Zentrifugation größerer Reaktionsgefäße (15 und 50 ml) eine Heraeus Multifuge. Der Erwärmung von Reaktionsgefäßen auf eine definierte Temperatur dienten Thermomixer (Eppendorf, Hamburg).

4.1.6 Sonstige Materialien

Blottingpapier (Roth)

Cryo-Röhrchen (Sarstedt)

Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml; Sarstedt)

Reagenzgläser (Schott, Mainz)

Schikanekolben (100 ml, 250 ml, 1 L, 5 L; Schott)

Glasperlen (Sigma)

Kunststoff-Küvetten (Sarstedt)

MobiSpin Columns (MoBiTec, Göttingen)

Nylon-Membran (Roth)

Petrischalen (Sarstedt)

Pipettenspitzen (Sarstedt)

PVDF-Membran (Roth)

Sterile Spritzen und Kanülen (Braun, Melsungen)

Sterilfilter (Sarstedt)

4.2 Kultivierung von Mikroorganismen

Alle verwendeten Medien wurden bei 121°C für 20 min autoklaviert.

4.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in dYT-Medium bzw. SOB-Medium ohne Magnesium schüttelnd bei 200 Upm bzw. auf dYT-Festmedium bei 37°C bzw. bei Raumtemperatur. Als Antibiotikum zur Selektion auf Plasmide wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt.

dYT-Flüssigmedium

1,6% (w/v) Trypton-Pepton

1,0% (w/v) Hefeextrakt

0,5% (w/v) NaCl

in H₂O_{bid.}

(Festmedium: 2% (w/v) Bactoagar)

SOB-Flüssigmedium ohne Magnesium

0,5% (w/v) Hefeextrakt

2% (w/v) Trypton/Pepton

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

in H₂O_{bid.}

4.2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae Stämme wurden generell bei 30°C inkubiert. Flüssigkulturen wurden bei 180 Upm schüttelnd in YPD-Medium oder in Synthetic Complete (SC)-Medium angezogen. Um Selektionsbedingungen zu erzeugen, wurde im Fall von Auxotrophie-Markern auf den Zusatz der entsprechenden Aminosäuren oder von Uracil in SC-Medium verzichtet. Festmedien basierten ebenfalls auf SC-Medium bzw. YPD Medium. Zur Selektion auf Transformationsereignisse wurde außerdem Nourseothricin (clonNAT) in einer Konzentration von 150 µg/ml, Geneticin (G418) in einer Konzentration von 200 µg/ml und Hygromycin B in einer Konzentration von 300 µg/ml verwendet. Dauerkulturen wurden nach Zugabe 50% NSY-Glycerin bei -80°C gelagert.

Für die Induktion von Peroxisomen wurden Flüssigkulturen in YPD mit einem Glucose-Gehalt von 0,1% (w/v) über Nacht schüttelt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit sterilem H₂O_{bid} gewaschen und in YNBO Medium für 12 h bei 30°C schütteln inkubiert.

YPD-Medium

2% (w/v) Pepton
1% (w/v) Hefeextrakt
2% (w/v) Glucose (nach dem Autoklavieren)
in H₂O_{bid.}
(Festmedium: 2% (w/v) Bactoagar)

SC-Medium

0,17% (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o amino acids
0,5% (w/v) Ammoniumsulfat
2% (w/v) Glucose (nach dem Autoklavieren hinzugefügt)
0,2% (w/v) Dropoutmix zusammengesetzt aus:
2 g L-Alanin
2 g L-Arginin
2 g L-Asparaginsäure
2 g L-Asparagin
2 g L-Cystein
2 g L-Glutaminsäure
2 g L-Glutamin
2 g L-Glycin
2 g Inositol
2 g L-Isoleucin
2 g L-Lysin
0,2 g p-Aminobenzoesäure
2 g L-Phenylalanin
2 g L-Prolin
2 g L-Serin
2 g L-Threonin
2 g L-Valin
0,04% (w/v) L-Histidin
0,01% (w/v) L-Adenin
0,04% (w/v) L-Tryptophan
0,08% (w/v) L-Leucin
0,04% (w/v) Uracil
je nach Selektionsbedingung wurden einzelne dieser Komponenten nicht zugesetzt
(Festmedium: 2% (w/v) Bactoagar)
in H₂O_{bid.}; pH 5,6

YNBO-Medium

0,1% (w/v) Hefeextrakt
0,17% (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o amino acids
0,5% (w/v) Ammoniumsulfat
0,1% (v/v) Ölsäure
0,05% (v/v) Tween-40
in H₂O_{bid.}; pH 6, eingestellt mit KOH

NSY-Glycerin

0,8% (w/v) Nutrient Broth
0,1% (w/v) Hefeextrakt
0,5% (w/v) Saccharose
69,6 % (v/v) Glycerin
in H₂O_{bid}

4.2.3 Kultivierung von *U. maydis*

U. maydis wurde entweder in YEPS_{light}-Flüssigmedium oder YNB-Flüssigmedium bei 28°C und 180 Upm inkubiert. Als Festmedien dienten Potato-Dextrose- (PD) oder YNB-Agar. Zur Selektion wurden die Antibiotika Carboxin (2 µg/ml), Hygromycin (200 µg/ml), Nourseothricin (150 µg/ml) oder Geneticin (400 µg/ml) eingesetzt. Dauerkulturen wurden nach Zugabe 50% NSY-Glycerin (siehe oben) bei -80°C gelagert. Für alle Experimente wurden Kulturen aus der logarithmischen Wachstumsphase verwendet.

YEPS-Medium

1% (w/v) Hefeextrakt
0,4% (w/v) Pepton
0,4% (w/v) Saccharose
in H₂O_{bid.}

YNB-Medium

0,17% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids
0,5% Ammoniumsulfat
als Kohlenstoffquellen wurden verwendet:
2% (w/v) Glucose
0,01% (v/v) Ölsäure/0,05% (v/v) Tween-40
0,01% (v/v) Linolsäure/0,05% (v/v) Tween-40
10 mM L-Prolin
1% (v/v) Glycerin

in H₂O_{bid.}; pH = 5,6
(Festmedium: 2% (w/v) Bactoagar)

PD-Festmedium

2,4% Potato Dextrose Broth
2% Bactoagar
in H₂O_{bid.}
(zum Teil + 1% (w/v) Aktivkohle)

4.2.4 Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Kulturen

Die optische Dichte von Kulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt. Dabei wurden Kulturen über einer OD₆₀₀ von 1 verdünnt, um einen in etwa linearen Zusammenhang von OD zur Zellzahl sicherzustellen. Als Referenz diente nicht bewachsenes Kulturmedium.

4.3 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

4.3.1 *E. coli* Stämme

Für sämtliche Klonierungen wurde der *E. coli* Stamm Top Ten (Invitrogen, Karlsruhe) mit dem folgenden Genotyp verwendet: F⁻, *mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Phi80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, *deoR*, *recA1*, *araD139*, $\Delta(ara-leu)7697$, *galU*, *galK*, *rpsL*(Str^R), *endA1*, *nupG*.

4.3.2 *S. cerevisiae* Stämme

Alle verwendeten *S. cerevisiae* Stämme waren Derivate von BY4741 mit dem Genotyp MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0 oder BY4742 mit dem Genotyp MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0 (Mortimer & Johnston, 1986; Euroscarf). Von den Deletionsmutanten wurden in den meisten Fällen drei, aber zumindest zwei unabhängige Mutanten phänotypisch charakterisiert. Bei den unten aufgelisteten Stämmen handelt es sich um Derivate von BY4741 falls keine anderweitigen Angaben gemacht werden.

Tab. 1: *S. cerevisiae* Stämme

Stammbezeichnung	Genotyp	Resistenz/Auxotrophie	Referenz
GFP-Sps19	<i>P_{ADHI}:gfp-sps19</i>	Nat ^R	Diese Arbeit
Ant1-YFP	<i>ant1-mycitrine</i>	Nat ^R	Diese Arbeit
GFP-Sps19 Ptc5-RFP	<i>P_{ADHI}:gfp-sps19</i> <i>pTEF1-Ptc5-tagRFP</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit
GFP-Sps19 Ptc5-RFP-PTS	<i>P_{ADHI}:gfp-sps19</i> <i>pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{Ptc5}</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit
Ant1-YFP Ptc5-RFP	<i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5-tagRFP</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit
Ant1-YFP Ptc5-RFP-PTS	<i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{Ptc5}</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit
Ant1-YFP Ptc5-3xHA	<i>P_{ADHI}:gfp-sps19</i> <i>ptc5-3xha</i>	Nat ^R , Gent ^R	Diese Arbeit
Ant1-YFP Ptc5-3xHA-PTS	<i>P_{ADHI}:gfp-sps19</i> <i>ptc5-3xha-pts_{Ptc5}</i>	Nat ^R , Gent ^R	Diese Arbeit
BY4742 Δ ptc5	Δ ptc5	Gent ^R	Euroscarf
BY4742 Δ pex5	Δ pex5	Gent ^R	Euroscarf
BY4742 Δ pex6	Δ pex6	Gent ^R	Euroscarf

BY4742 Δ pex14	Δ pex14	Gent ^R	Euroscarf
BY4742 Δ imp1	Δ imp1	Gent ^R	Euroscarf
BY4742 Δ imp2	Δ imp2	Gent ^R	Euroscarf
BY4742 Δ coq9	Δ coq9	Gent ^R	Euroscarf
BY4742 Δ pex5 Ant1-YFP	Δ pex5 <i>ant1-mycitrine</i>	Gent ^R , Nat ^R	Diese Arbeit
Gpd1-GFP	<i>gpd1-gfp</i>	Hyg ^R	Diese Arbeit
BY4742 Δ ptc5 Gpd1-GFP	Δ ptc5 <i>gpd1-gfp</i>	Gent ^R , Hyg ^R	Diese Arbeit
BY4742 Δ pex6 Ant1-YFP	Δ pex6 <i>ant1-mycitrine</i>	Gent ^R , Nat ^R	Diese Arbeit
BY4742 Δ pex14 Ant1-YFP	Δ pex14 <i>ant1-mycitrine</i>	Gent ^R , Nat ^R	Diese Arbeit
BY4742 Δ imp1 Ant1-YFP	Δ imp1 <i>ant1-mycitrine</i>	Gent ^R , Nat ^R	Diese Arbeit
BY4742 Δ pex5 Ant1-YFP Ptc5-RFP	Δ pex5 <i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5-tagRFP</i>	Gent ^R , Nat ^R / HIS	Diese Arbeit
BY4742 Δ pex5 Ant1-YFP Ptc5-RFP-PTS	Δ pex5 <i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5-tagRFP- PTS_{Ptc5}</i>	Gent ^R , Nat ^R / HIS	Diese Arbeit
BY4742 Δ imp1 Ant1-YFP Ptc5-RFP	Δ imp1 <i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5-tagRFP</i>	Gent ^R , Nat ^R / HIS	Diese Arbeit
BY4742 Δ imp1 Ant1-YFP Ptc5-RFP-PTS	Δ imp1 <i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{Ptc5}</i>	Gent ^R , Nat ^R / HIS	Diese Arbeit
BY4742 Δ imp2 Ant1-YFP Ptc5-RFP-PTS	Δ imp2 <i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5-tagRFP- PTS_{Ptc5}</i>	Gent ^R , Nat ^R / HIS	Diese Arbeit
BY4742 Δ coq9 Ant1-YFP Ptc5-RFP-PTS	Δ coq9 <i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5-tagRFP- PTS_{Ptc5}</i>	Gent ^R , Nat ^R / HIS	Diese Arbeit
BY4742 Δ pex6 Ant1-YFP Ptc5-RFP-PTS	Δ pex6 <i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5-tagRFP- PTS_{Ptc5}</i>	Gent ^R , Nat ^R / HIS	Diese Arbeit
BY4742 Δ pex14 Ant1-YFP Ptc5-RFP-PTS	Δ pex14 <i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5-tagRFP- PTS_{Ptc5}</i>	Gent ^R , Nat ^R / HIS	Diese Arbeit

GFP-Sps19	<i>P_{ADHI}:gfp-sps19</i>	Nat ^R / HIS	Diese Arbeit
Ptc5-RFP-PTS	<i>pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{Ptc5}</i>		
BY4742 $\Delta imp1$	<i>\Delta imp1</i>		
GFP-Sps19	<i>P_{ADHI}:gfp-sps19</i>	Gent ^R , Nat ^R / HIS	Diese Arbeit
Ptc5-RFP-PTS	<i>pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{Ptc5}</i>		
BY4742 $\Delta imp1$	<i>\Delta imp1</i>		
Ptc5 ¹⁻²⁰¹ -RFP-HA	<i>pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA</i>	Gent ^R / HIS	Diese Arbeit
Ptc5 ¹⁻²⁰¹ -RFP-HA	<i>pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA</i>	HIS	Diese Arbeit
BY4742 $\Delta imp2$	<i>\Delta imp2</i>		
Ant1-YFP	<i>ant1-mycitrine</i>	Gent ^R , Nat ^R / HIS	Diese Arbeit
Ptc5 ¹⁻²⁰¹ -RFP-HA	<i>pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA</i>		
BY4742 $\Delta coq9$	<i>\Delta coq9</i>		
Ant1-YFP	<i>ant1-mycitrine</i>	Gent ^R , Nat ^R / HIS	Diese Arbeit
Ptc5 ¹⁻²⁰¹ -RFP-HA	<i>pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA</i>		
Ant1-YFP	<i>ant1-mycitrine</i>		
Ptc5 ¹⁻²⁰¹ -RFP-PTS	<i>pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-PTS</i>	Gent ^R , Nat ^R / HIS	Diese Arbeit
BY4742 $\Delta imp2$	<i>\Delta imp2</i>		
Ant1-YFP	<i>ant1-mycitrine</i>	Gent ^R , Nat ^R / HIS	Diese Arbeit
Ptc5 ¹⁻²⁰¹ -RFP-PTS	<i>pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-PTS</i>		
BY4742 $\Delta coq9$	<i>\Delta coq9</i>		
Ant1-YFP	<i>ant1-mycitrine</i>	Gent ^R , Nat ^R / HIS	Diese Arbeit
Ptc5 ¹⁻²⁰¹ -RFP-PTS	<i>pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-PTS</i>		
GFP-Sps19	<i>P_{ADHI}:gfp-sps19</i>	Nat ^R , HIS	Diese Arbeit
Ptc5 ¹⁻⁸⁰ -RFP-HA	<i>pTEF1-Ptc5¹⁻⁸⁰-tagRFP-HA</i>		
GFP-Sps19	<i>P_{ADHI}:gfp-sps19</i>	Nat ^R , HIS	Diese Arbeit
Ptc5 ¹⁻⁸⁵ -RFP-HA	<i>pTEF1-Ptc5⁸⁵-tagRFP-HA</i>		
GFP-Sps19	<i>P_{ADHI}:gfp-sps19</i>	Nat ^R , HIS	Diese Arbeit
Ptc5 ¹⁻⁹⁰ -RFP-HA	<i>pTEF1-Ptc5¹⁻⁹⁰-tagRFP-HA</i>		
BY4742 $\Delta imp1$	<i>\Delta imp1</i>		
GFP-Sps19	<i>P_{ADHI}:gfp-sps19</i>	Gent ^R , Nat ^R , HIS	Diese Arbeit
Ptc5 ¹⁻⁸⁰ -RFP-HA	<i>pTEF1-Ptc5¹⁻⁸⁰-tagRFP-HA</i>		
BY4742 $\Delta imp1$	<i>\Delta imp1</i>		
GFP-Sps19	<i>P_{ADHI}:gfp-sps19</i>	Gent ^R , Nat ^R , HIS	Diese Arbeit
Ptc5 ¹⁻⁸⁵ -RFP-HA	<i>pTEF1-Ptc5¹⁻⁸⁵-tagRFP-HA</i>		
BY4742 $\Delta imp1$	<i>\Delta imp1</i>		
GFP-Sps19	<i>P_{ADHI}:gfp-sps19</i>	Gent ^R , Nat ^R , HIS	Diese Arbeit
Ptc5 ¹⁻⁹⁰ -RFP-HA	<i>pTEF1-Ptc5¹⁻⁹⁰-tagRFP-HA</i>		
Ant1-YFP	<i>ant1-mycitrine</i>		
Ptc5 ^{Δ1-83} -RFP	<i>pTEF1-Ptc5^{Δ1-83}-tagRFP</i>	Nat ^R , HIS	Diese Arbeit

Ant1-YFP Ptc5 ^{Δ1-83} -RFP-PTS	<i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5^{Δ1-83}-tagRFP-PTS_{Ptc5}</i>	Nat ^R , HIS	Diese Arbeit
BY4742 Δpex5 Ant1-YFP Ptc5 ^{Δ1-83} -RFP-PTS	<i>Δpex5</i> <i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5^{Δ1-83}-tagRFP-PTS_{Ptc5}</i>	Gent ^R , Nat ^R , HIS	Diese Arbeit
Ant1-YFP Ptc5 ^{ΔTM} -RFP	<i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5^{ΔTM}-tagRFP</i>	Nat ^R , HIS	Diese Arbeit
Ant1-YFP Ptc5 ^{ΔTM} -RFP-PTS	<i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5^{ΔTM}-tagRFP-PTS_{Ptc5}</i>	Nat ^R , HIS	Diese Arbeit
BY4742 Δpex5 Ant1-YFP Ptc5 ^{ΔTM} -RFP-PTS	<i>Δpex5</i> <i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5^{ΔTM}-tagRFP-PTS_{Ptc5}</i>	Gent ^R , Nat ^R , HIS	Diese Arbeit
Ant1-YFP Ptc5 ^{Δ1-83} -tagRFP D302A	<i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5^{Δ1-83(D302A)}-tagRFP</i>	Nat ^R , HIS	Diese Arbeit
Ant1-YFP Ptc5 ^{Δ1-83} -tagRFP D424A	<i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5^{Δ1-83(D424A)}-tagRFP</i>	Nat ^R , HIS	Diese Arbeit
GFP-Sps19 Ptc5 ^{1-201(D84K)} -RFP-HA	<i>P_{ADHI}:gfp-sps19</i> <i>pTEF1-Ptc5^{1-201(D84K)}-tagRFP-HA</i>	Nat ^R / HIS	Diese Arbeit
GFP-Sps19 Ptc5 ^{1-201(Δ81-84)} -RFP-HA	<i>P_{ADHI}:gfp-sps19</i> <i>pTEF1-Ptc5^{1-201(Δ81-84)}-tagRFP-HA</i>	Nat ^R / HIS	Diese Arbeit
GFP-Sps19 Ptc5 ^{Δ81-84} -RFP-PTS	<i>P_{ADHI}:gfp-sps19</i> <i>pTEF1-Ptc5^{Δ81-84}-tagRFP-PTS_{Ptc5}</i>	Nat ^R / HIS	Diese Arbeit
Ant1-YFP Ptc5-RFP-PTS _{LE1}	<i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{LE1}</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit
Ant1-YFP Ptc5-RFP-PTS _{LE2}	<i>ant1-mycitrine</i> <i>pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{LE2}</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit
Ant1-YFP Tim50-CFP	<i>ant1-yfp</i> <i>tim50-cfp</i>	Nat ^R , Gent ^R	Diese Arbeit
Ant1-YFP / Tim50-CFP Pxp2-RFP	<i>ant1-mycitrine tim50-cfp</i> <i>pTEF1-Pxp2-tagRFP</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit
Ant1-YFP / Tim50-CFP Pxp2-RFP-PTS	<i>ant1-mycitrine tim50-cfp</i> <i>pTEF1-Pxp2-tagRFP-PTS_{Pxp2}</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit
Ant1-YFP / Tim50-CFP Mss2-RFP	<i>ant1-mycitrine tim50-cfp</i> <i>pTEF1-Mss2-tagRFP</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit
Ant1-YFP / Tim50-CFP Mss2-RFP-PTS	<i>ant1-mycitrine tim50-cfp</i> <i>pTEF1-Mss2-tagRFP-PTS_{Mss2}</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit
Ant1-YFP / Tim50-CFP Dpi8-RFP	<i>ant1-mycitrine tim50-cfp</i> <i>pTEF1-Dpi8-tagRFP</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit
Ant1-YFP / Tim50-CFP Dpi8-RFP-PTS	<i>ant1-mycitrine tim50-cfp</i> <i>pTEF1-Dpi8-tagRFP-PTS_{Dpi8}</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit

Ant1-YFP	<i>ant1-mycitrine</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit
Rml2-RFP	<i>pTEF1-Rml2-tagRFP</i>		
Ant1-YFP	<i>ant1-mycitrine</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit
Rml2-RFP-PTS	<i>pTEF1-Rml2-tagRFP-PTS_{Rml2}</i>		
Tim50-YFP	<i>tim50-mycitrine</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit
Rml2-RFP	<i>pTEF1-Rml2-tagRFP</i>		
Tim50-YFP	<i>tim50-mycitrine</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit
Rml2-RFP-PTS	<i>pTEF1-Rml2-tagRFP-PTS_{Rml2}</i>		
Ant1-YFP	<i>ant1-mycitrine</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit
Dpi8-RFP	<i>pTEF1-Dpi8-tagRFP</i>		
Ant1-YFP	<i>ant1-mycitrine</i>	Nat ^R / His	Diese Arbeit
Dpi8-RFP-PTS	<i>pTEF1-Dpi8-tagRFP-PTS_{Dpi8}</i>		

4.3.3 *U. maydis* Stämme

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten *U. maydis* Stämme aufgeführt. Die Stämme wurden überwiegend während dieser Arbeit hergestellt. Von den Deletionsmutanten wurden in den meisten Fällen drei, aber zumindest zwei unabhängige Mutanten phänotypisch charakterisiert. Bei Stämmen mit *ip*-Locus Integrationen wurde, wenn im Text bemerkt mit Southern Analyse die Häufigkeit der Integration bestimmt. Bei allen unten genannten Stämmen handelt es sich um Abkömmlinge von Bub8.

Tab. 2 *U. maydis* Stämme

Stammbezeichnung	Genotyp	Resistenz	Referenz
Bub8	<i>a2 b4</i>	—	Schulz <i>et al</i> , 1990
Δ pex5b	<i>a2 b4 Δpex5b</i>	Nat ^R	Ast, 2017
mCherry-SKL	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i>	Hyg ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
mCherry-SKL GFP-PTS1 _{UmPtc5}	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>P_{otef}:egfp-umptc5⁷⁵³⁻⁷⁶⁵</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Diese Arbeit

Mito-mCherry	<i>a2 b4 P_{mrbl}:mrbl¹⁻⁴⁶-egfp</i>	Hyg ^R	Diese Arbeit
Mito-mCherry OTEF-UmPtc5-GFP	<i>a2 b4 P_{mrbl}:mrbl¹⁻⁴⁶-egfp</i> <i>ip^R[P_{otef}:umptc5-gfp]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Diese Arbeit
Pex12-mCherry	<i>a2 b4 P_{otef}:um00297-mcherry</i>	Gent ^R	Diese Arbeit
Δpex5b Pex12-mCherry	<i>a2 b4 Δpex5b</i> <i>P_{otef}:um00297-mcherry</i>	Nat ^R , Gent ^R	Diese Arbeit
Mito-GFP	<i>a2 b4 P_{otef}:mito-gfp</i>	Hyg ^R	Diese Arbeit
Δpex5b Pex12-mCherry OTEF-UmPtc5-GFP	<i>a2 b4 Δpex5b</i> <i>P_{otef}:um00297-mcherry</i> <i>ip^R[P_{otef}:umptc5-gfp]ip^S</i>	Nat ^R , Gent ^R , Cbx ^R	Diese Arbeit
Δpex5b Pex12-mCherry OTEF-UmPtc5-GFP-PTS	<i>a2 b4 Δpex5b</i> <i>P_{otef}:um00297-mcherry</i> <i>ip^R[P_{otef}:umptc5-gfp-PTS_{Ptc5}]ip^S</i>	Nat ^R , Gent ^R , Cbx ^R	Diese Arbeit
mCherry-SKL UmPtc5-GFP	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ptc5-gfp</i>	Hyg ^R , Nat ^R	Diese Arbeit
mCherry-SKL UmPtc5-GFP-PTS	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ptc5-gfp-pts</i>	Hyg ^R , Nat ^R	Diese Arbeit
mCherry-SKL Sec63-GFP	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:sec63-gfp]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Diese Arbeit
mCherry-SKL Sec63-GFP-PTS	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:sec63-gfp-PTS_{Ptc5}]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Diese Arbeit

4.3.4 Plasmide

In der nachfolgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide dargestellt mit zugehörigen Referenzen dargestellt.

Tab. 2 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Resistenz / Auxotrophie	Referenz
pbs-hhn	Amp ^R , Hyg ^R	Kämper, 2004
pMF-1n	Amp ^R , Nat ^R	Brachmann <i>et al</i> , 2004
pMF-1g	Amp ^R , Kan ^R , Gent ^R	Baumann <i>et al</i> , 2012
pMF5-1n	Amp ^R , Nat ^R	Becht <i>et al</i> , 2006
		Kay Schink, pers.
pJet2.1 + Stuffer	Amp ^R	Mitteilung
p123-mCherry	Amp ^R , Cbx ^R	Doehlemann <i>et al</i> , 2009
potef-GFP-ALA ₆ -MMXN	Amp ^R , Cbx ^R	Böhmer <i>et al</i> , 2008
potef-mCherry-Ala6-MMXN	Amp ^R , Cbx ^R	Julia Ast, pers.
		Mitteilung
potef-Pex12-GFP-ALA ₆ -MMXN	Amp ^R , Cbx ^R	Julia Ast, pers.
		Mitteilung
pFA6a-KanMX4	Amp ^R , Kan ^R , Gent ^R	Wach <i>et al</i> , 1994
pKS133	Amp ^R , Hyg ^R	Janke <i>et al</i> , 2004
pKS134	Amp ^R , Nat ^R	Janke <i>et al</i> , 2004
pCT310	Amp ^R / HIS	Renicke <i>et al</i> , 2013b
pCT320	Amp ^R / LEU	Renicke <i>et al</i> , 2013a
pSM1960	Amp ^R , URA	Metzger <i>et al</i> , 2008

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide mit verwendeten Oligonukleotiden und Klonierungsstrategien beschrieben. Oligonukleotide sind immer in 5'-3' Richtung angegeben. Restriktionsschnittstellen sind in Rot hervorgehoben. Die Teile der Oligonukleotide, die direkt der Amplifikation auf der ersten Matrize dienen, sind in Großbuchstaben und Überhänge in Kleinbuchstaben gezeigt. Plasmide wurden vor der Verwendung sequenziert.

pGFP-UmPtc5

Dieses Plasmid enthält den ORF von *ptc5* (*um01286*) aus *U. maydis* inseriert in die *MluI*- und *NotI*-

pUmPtc5-GFP

Dieses Plasmid enthält den ORF von *ptc5* inseriert in die *BamHI*- und *NcoI*-Schnittstelle von pOTEF, um eine C-terminale GFP-Fusion zu erzeugen.

Schnittstelle pOTEF inseriert, um eine N-terminale GFP-Fusion zu erzeugen.

Oligonukleotide

MI090(„Forward“):

atat**acgcgt**GATGGTTGGCGCACAGCGGTGG

MI091(„Reverse“):

atat**gcggccgc**TCAAAGCTTGGCTTTGATCG

pUmPtc5-GFP-PTS_{Ptc5}

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pPtc5-GFP, in dem der *egfp* ORF ersetzt wurde durch einen *egfp* ORF gefolgt von dem PTS1 Signal von *ptc5* (die letzten 12 Codons inkl. Stop). Für die Klonierung wurde die *MluI*- und *NotI*-Schnittstelle verwendet.

MI088:

atat**ccatggc**AAGCTTGGCTTTGATCGGGG

MI089:

atat**gcggccgctt**caagcttgcttgatcggggacgcagttgaatc
GATGGCCACGCGTGCGGCGG

pMrb1-mCherry

Dieses Plasmid wurde analog zu pMrb1-GFP kloniert, allerdings wurde das *mrbl* Fragment in p123-mCherry inseriert.

pBS-hhn-Mrb1-mCherry

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pBS-hhn. Das *P_{mrbl}-mrbl¹⁻⁴⁶-mCherry-T_{nos}* Fragment von pMrb1-mCherry wurde mittels PCR amplifiziert und in die *KpnI*-Schnittstelle von pBS-hhn inseriert. Das Plasmid wurde mit *SspI* linearisiert und für ektopische Integrationen in das *U. maydis* Genom genutzt.

MI319:

atat**gtacc**GTTGCAAGCCCGCTGGTTG

MJ320: atat**gtacc**AATCATCGCAAGACCGGC

pMF-1g-Mrb1-mCherry

Dieses Plasmid wurde analog zu pBS-hhn-Mrb1-mCherry kloniert, allerdings wurde pMF-1g als Vektor verwendet.

MI147:

atat**ggatcc**acaATGGTTGGCGCACAGCGGTGG

MI088: atat**ccatggc**AAGCTTGGCTTTGATCGGGG

pMrb1-GFP

Dieses Plasmid enthält den *mrbl* Promotor die ersten 46 Codons des *mrbl* ORFs inseriert in die *KpnI*- und *NcoI*-Schnittstelle von pOTEF.

MH990:

atat**catatg**GTTGCAAGCCCGCTGGTTGATG

MH991:

atat**ccatggc**AACCGAAAACGTGCGCATACC

pBS-hhn-Mrb1-GFP

Dieses Plasmid wurde analog zu pBS-hhn-Mrb1-mCherry kloniert, allerdings wurde das *P_{mrbl}-mrbl¹⁻⁴⁶-egfp-T_{nos}* Fragment von pMrb1-GFP verwendet.

pMF-1g-Mrb1-GFP

Dieses Plasmid wurde analog zu pMF-1g-Mrb1-mCherry kloniert, allerdings wurde das *P_{mrbl}-mrbl¹⁻⁴⁶-egfp-T_{nos}* Fragment von pMrb1-GFP verwendet.

pMF5-1n-GFP-PTS_{Ptc5}

Dieses Plasmid enthält einen *egfp* ORF gefolgt von den letzten 12 Codons des *ptc5* ORFs (inkl. Stop) inseriert in die *XhoI*- und *AscI*-Schnittstelle von pMF5-1N. Es wurde zur Herstellung der C-terminalen GFP-PTS_{Ptc5}-Fusion am endogenen Locus verwendet.

MI582:

atat**ctcgag**GCCAACGCGGCCACCATGGTG

MI583:

atat**ggcgcgc**ggccgcttcaagcttgcttgatcgggga
cgcagttgaatcCTTGTACAGCTCGTCCATGC

pSec63-GFP-PTS_{Ptc5}

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pPtc5-GFP-PTS_{Ptc5}, in dem der *ptc5* ORF ersetzt wurde durch die Insertion des *sec63* ORFs in die *BamHI*- und *NcoI*-Schnittstelle.

MJ039:

atat**ggatcc**acaATGGCCGAATACAAATATGAC

pPex12-mCherry

Das *XmaI*/*NcoI* Fragment von *potef*-Pex12-GFP-ALA₆-MMXN wurde in die *XmaI*- und *NcoI*-Schnittstelle von *potef*-mCherry-ALA₆-MMXN inseriert.

pMF-1g-Pex12-mCherry

Das *P_{oer-pex12-mCherry-T_{nos}}* Fragment von pPex12-mCherry wurde in die *KpnI*-Schnittstelle von pMF-1g inseriert.

MI319: atatggtaccGTTGCAAGCCCGCTGGTTG

MJ320: atatggtaccAATCATCGCAAGACCGGC

pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{Ptc5}

Analog zu pTEF1-Ptc5-tagRFP, allerdings wurde der *tagRFP* ORF am 5' Ende um die letzten 13 Codons (inkl. Stopp) des *ptc5* ORFs erweitert.

MJ484, MJ485, MK227, MJ221, MJ222:

Siehe pTEF1-Ptc5-tagRFP

MJ224:

atgtaagcgtgacataactaattacatgactcgagtcataatctagggtttgg
ctttgttgttgctccgggtTTTATGACCTAATTTAGATG

pTEF1- Ptc5^{Δ1-83}-tagRFP

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA. Der *ptc5* ORF ohne die ersten 83 Codons, gefolgt von dem Leserahmen von *tagRFP* wurden in das *BamHI/XhoI* Fragment von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA durch Gibson Assembly inseriert. Das inserierte Fragment wurde durch eine PCR-Reaktion mit pTEF1-Ptc5-tagRFP als Matrize hergestellt.

MK500: catagcaatctaataagttttaattacaaaggatccATG
GATACAATTAACGGAATAAAAGATTATTC

MJ223: siehe pTEF1-Ptc5-tagRFP

pTEF1-Ptc5^{Δ1-83}-tagRFP-PTS_{Ptc5}

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA. Der *ptc5* ORF ohne die ersten 83 Codons, gefolgt von dem Leserahmen von *tagRFP* und den letzten 13 Codons des *ptc5* ORFs (inkl.

MJ040:

atatccatggcATCCGAGTCGCTATCGCTATC

pSec63-GFP

Dieses Plasmid enthält den ORF von *sec63* (*um06175*) aus *U. maydis* inseriert in die *Bam*HI- und *Nco*I-Schnittstelle von pOTEF.

MJ039:

atat**ggatcc**acaATGGCCGAATACAAATATGAC

MJ040:

atatccatggcATCCGAGTCGCTATCGCTATC

pTEF1-Ptc5-tagRFP

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pCT310. Der *tef1* Promotor, gefolgt von dem *ptc5* ORF und dem Leserahmen von *tagRFP* wurden in das *AgeI/XhoI* Fragment von pCT310 durch homologe Rekombination in Hefe inseriert.

MJ484:

atgattacgccaagcgcgcaattaaccctcactaaagggaacaa

aagctgGATCCCCACACCATAGC

MJ485: cctaaccgttttctttatagctacggttctagttaagggagaca

tgatccTTTGTAAATAAACTTAGATTAGATTGC

MK227: ATGTCTCCCTTAAGTAGAACC

MJ221: ttcatatgcatattttctttaattaattcagacat

TAATCTAGGTTTTGGCTTTG

MJ222: acccggaggcaacaacaagccaaaacctagatta

ATGTCTGAATTAATTAAAG

MJ223: atgtaagcgtgacataactaattacatga

CTCGAGTTATTTATGACCTAATTAG

pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pCT310. Der *tef1* Promotor, gefolgt von den ersten 201 Codons des *ptc5* ORFs, dem Leserahmen von *tagRFP* und eines *ha* Epitops wurden in das *AgeI/XhoI* Fragment von pCT310 durch Gibson Assembly inseriert.

MK272: ttacgccaagcgcgcaattaaccctcactaaagggaac

aaaagctGATCCCCACACACCATAGC

MJ485: siehe pTEF1-Ptc5-tagRFP

MK386: agcatagcaatctaataagttttaattacaaaggatcc

Stopp) wurden in das *BamHI/XhoI* Fragment von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA durch Gibson Assembly inseriert. Das inserierte Fragment wurde durch eine PCR-Reaktion mit pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{Ptc5} als Matrize hergestellt.

MK500: catagcaatctaactaagttttaattacaaggatccATG
GATACAATTAACGGAATAAAAGATTATTC

MJ224: siehe pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{Ptc5}

pYM1-3xHA-PTS_{Ptc5}

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pYM1. Die kodierende Sequenz der drei *ha*-tags wurde am 5' Ende um das PTS1 von *ptc5* erweitert, indem das mit den Primern MK365 und MK366 in das *XmnI/AscI* Fragment von pYM1 kloniert wurde.

MK365: atatgaaaacgttcctcgggcg

MK366: atatggcgcgccataacctaggctttgtttgtgttgcct
ccgattgcactgagcagcgaatctg

pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{LE1}

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{Ptc5}. Der ORF von tagRFP gefolgt von dem PTS1 der peroxisomalen Isoform des *gapdh* Gens von *A. nidulans* (Freitag *et al.*, 2012) wurde in durch homologe Rekombination in Hefe in das *XbaI/XhoI* Fragment inseriert.

MJ222: siehe pTEF1-Ptc5-tagRFP

MK834: gggagggcgatgaatgaagcgtgacataactaattacatg
actcgagTTACAAGGAGCTCCTGGCCATTGGCTT
CCGACCTGTTTCtttatgacctaatttagatgg

pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{LE2}

Dieses Plasmid wurde analog zu pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{LE1} kloniert, allerdings wurde der *tagRFP* ORF gefolgt vom PTS1 der peroxisomalen Isoform des *pgk* Gens von *A. nidulans* (Freitag *et al.*, 2012) inseriert.

MJ222: siehe pTEF1-Ptc5-tagRFP

MK835: gggagggcgatgaatgaagcgtgacataactaattacatg
actcgagTCAGAGACGTGGCGACTTTTCCGAGA
GAGCAGCGACACCTttatgacctaatttagatgg

ATGTCTCCCTTAAGTAGAACCG

MK387: ataattcatatgcatattttttaattaattcagacat

ACCACCATGTCCATCAAAAATTC

MK388: ATGTCTGAATTAATTAAGAAAAT

ATGCATATG

MK389: aatgtaagcgtgacataactaattacatgactcgagtcacg

catagtcaggaacatcgatgggtaaaagattccTTTATGACCT

AATTTAGATGGTAAATCAC

pTEF1-Ptc5^{1-201(D84K)}-tagRFP-HA

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA. Die ersten 201 Codons des *ptc5* ORFs mit einer D84K Substitution gefolgt vom Leserahmen eines *tagRFP* und eines *ha* Eitops wurden in das *BamHI/XhoI* Fragment von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA durch Gibson Assembly inseriert.

MK514: acaattaacggaataaaagattattctac

MK528: tgtagaataatctttattccgttaattgttttaaggagagga
tcttttaggggaatag

MK386, MK387, MK388, MK389: siehe pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA

pTEF1-Ptc5^{1-201(Δ81-84)}-tagRFP-HA

Analog zu pTEF1-Ptc5^{1-201(D84K)}-tagRFP-HA, allerdings fehlen die Codons 81-84 des *ptc5* ORFs anstelle der D84K Substitution.

MK564: tccgttaattgtgatcttttaggggaatagtaggag

MK565: ccctaaaaagatcacaattaacggaataaaagattattctac

MK386, MK387, MK388, MK389: siehe pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA

pTEF1-Ptc5^{Δ81-84}-tagRFP-PTS_{Ptc5}

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA. Der *ptc5* ORF ohne die Codons 81-84, gefolgt vom Leserahmen von tagRFP und den letzten 13 Codons des *ptc5* ORFs (inkl. Stopp) wurden in das *BamHI/XhoI* Fragment von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA durch Gibson Assembly inseriert.

MK515: tagcaatctaactaagttttaattacaaggatccatgtctcc
cttaactagaacc

MK564, MK565: siehe pTEF1-Ptc5^{Δ81-84}-tagRFP-HA

pTEF1- Ptc5^{Δ1-83(D302A)}-tagRFP

Dieses Plasmid wurde analog zu pTEF1-Ptc5^{Δ1-83}-tagRFP kloniert, allerdings enthielt der *ptc5* ORF eine D302A Substitution.

MK500: siehe pTEF1-Ptc5^{Δ1-83}-tagRFP

MJ223: siehe pTEF1-Ptc5-tagRFP

MK860: aaagcccttgaggtccagtgacagccacttc

MK861: gctgtcactggagcctcaaggccttaattgtgg

pTEF1- Ptc5^{Δ1-83(D424A)}-tagRFP

Dieses Plasmid wurde analog zu pTEF1-Ptc5^{Δ1-83}-tagRFP kloniert, allerdings enthielt der *ptc5* ORF eine D424A Substitution.

MK500: siehe pTEF1-Ptc5^{Δ1-83}-tagRFP

MJ223: siehe pTEF1-Ptc5-tagRFP

MK862: ttcgaataaacggccgaaccatcaccataaatttag

MK863: gatgggttcggccggtttattcgaattactaactaatgaag

pTEF1-Ptc5^{ΔTM}-tagRFP

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA. Der Leserahmen von *ptc5* ohne die Codons 55 bis 83 gefolgt von *tagRFP* wurde in das *BamHI/XhoI* Fragment von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA durch Gibson Assembly inseriert.

MK515: siehe pTEF1-Ptc5^{Δ81-84}-tagRFP-HA

MJ223: MJ222: siehe pTEF1-Ptc5-tagRFP

MK777: aatcttttattccggttaattgtatc

TGATGATATGAATAGCTTTGTCCTTG

MK778: gatacaattaacggaataaaagattattctac

pTEF1-Ptc5^{ΔTM}-tagRFP

Dieses Plasmid wurde analog zu pTEF1-Ptc5^{ΔTM}-tagRFP hergestellt allerdings folgten auf den *tagRFP* ORF die letzten 13 Codons (inkl. Stopp) von *ptc5*.

MK515: siehe pTEF1-Ptc5^{Δ81-84}-tagRFP-HA

MK777, MK778: siehe pTEF1-Ptc5^{ΔTM}-tagRFP

MJ224: siehe pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{Ptc5}

pTEF1-Pxp2-tagRFP-PTS_{Pxp2}

Analog zu pTEF1-Pxp2-tagRFP, allerdings wurde der *tagRFP* ORF am 5' Ende um die letzten 13 Codons (inkl. Stopp) des *pxp2* ORFs erweitert.

MJ221, MJ222: siehe pTEF1-Ptc5-tagRFP

MJ224: siehe pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{Ptc5}

pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-PTS

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA. Die ersten 201 Codons des *ptc5* ORFs und der Leserahmen von *tagRFP* gefolgt von den letzten 13 Codons (inkl. Stopp) des *ptc5* ORFs wurden in das *BamHI/XhoI* Fragment von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA durch Gibson Assembly inseriert.

MJ224: siehe pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{Ptc5}

MK386, MK387, MK388: siehe pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA

pTEF1-Ptc5¹⁻⁸⁵-tagRFP-HA

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA. Die ersten 85 Codons des *ptc5* ORFs, gefolgt von dem Leserahmen von *tagRFP* und eines *ha* Epitops wurden in das *BamHI/XhoI* Fragment von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA durch Gibson Assembly inseriert.

MK530: atgcatattttctttaattaattcagacat

TGTATCAAGGGAGAGGATCTTTTATAG

MK386, MK388, MK389: siehe pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA

pTEF1-Ptc5¹⁻⁸⁰-tagRFP-HA

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA. Die ersten 80 Codons des *ptc5* ORFs, gefolgt von dem Leserahmen von *tagRFP* und eines *ha* Epitops wurden in das *BamHI/XhoI* Fragment von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA durch Gibson Assembly inseriert.

MK529: atgcatattttctttaattaattcagacat

GATCTTTTATAGGGGAATAGTAGGAG

MK386, MK388, MK389: siehe pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA

pTEF1-Ptc5¹⁻⁹⁰-tagRFP-HA

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA. Die ersten 90 Codons des *ptc5* ORFs,

MK864, MK865, MK866: Siehe pTEF1-Pxp2-tagRFP

MK867: aagcgtgacataactaattacatgactcgagTTACAA
TTTTACAACACCAGATTTCCAACCAACACCA
Catttatgacctaatttagatggttaatc

pTEF1-Pxp2-tagRFP-PTS_{Pxp2}

Analog zu pTEF1-Mss2-tagRFP, allerdings wurde der *tagRFP* ORF am 5' Ende um die letzten 13 Codons (inkl. Stopp) des *mss2* ORFs erweitert.

MK870, MK871, MK872: Siehe pTEF1-Mss2-tagRFP

MK873: aagcgtgacataactaattacatgactcgagTTAAA
GCCGTGCTTTGTCCAGCAACTTTATGGAATCT
TTtttatgacctaatttagatggttaatc

pTEF1-Rml2-tagRFP-PTS_{Rml2}

Analog zu pTEF1-Rml2-tagRFP, allerdings wurde der *tagRFP* ORF am 5' Ende um die letzten 13 Codons (inkl. Stopp) des *rml2* ORFs erweitert.

MK874, MK875, MK876: Siehe pTEF1-Mss2-tagRFP

MK877: aagcgtgacataactaattacatgactcgagTTATAA
TCTTGCATCTTTGCCTCTTGGTCTGTCTTTTAC
tttatgacctaatttagatggttaatc

pTEF1-Dpi8-tagRFP

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA. Der Leserahmen von *dpi8* gefolgt vom *tagRFP* ORF wurden in das *BamHI/XhoI* Fragment von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA durch Gibson Assembly inseriert.

MK878: atctaataagttttaattacaaaggatcc

ATGATCGCCCAAAGTACCAG

MK879: ttaattcagacat

CAACTTTGGCGCGTGAGC

MK880: GCGCCAAAGTTG

atgtctgaattaattaagaaaatatgc

MJ223: siehe pTEF1-Ptc5-tagRFP

gefolgt von dem Leserahmen von *tagRFP* und eines *ha* Epitops wurden in das *BamHI/XhoI* Fragment von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA durch Gibson Assembly inseriert.

MK531: atgcatattttctttaattcagacat

TTTTATTCCGTTAATTGTATCAAGGG

MK386, MK388, MK389: siehe pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA

pTEF1-Pxp2-tagRFP

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA. Der Leserahmen von *pxp2* gefolgt vom *tagRFP* ORF wurden in das *BamHI/XhoI* Fragment von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA durch Gibson Assembly inseriert.

MK864: atctaataagttttaattacaaaggatcc

ATGAACCAGATACTAAATGCAC

MK865: taattcagacatCAATTTTACAACACCA

GATTTCC

MK866: TGTTGTAAAATTGatgtctgaattaattaaga

aaatatgc

MJ223: siehe pTEF1-Ptc5-tagRFP

pTEF1-Mss2-tagRFP

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA. Der Leserahmen von *mss2* gefolgt vom *tagRFP* ORF wurden in das *BamHI/XhoI* Fragment von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA durch Gibson Assembly inseriert.

MK870: atctaataagttttaattacaaaggatcc

ATGCAGAGGTTTGTTCAGTAAG

MK871: ttaattcagacat

AAGCCGTGCTTTGTCCAGC

MK872: AAAGCACGGCTT

atgtctgaattaattaagaaaatatgc

MJ223: siehe pTEF1-Ptc5-tagRFP-PTS_{Ptc5}

pTEF1-Rml2-tagRFP

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA. Der Leserahmen von *rml2* gefolgt vom *tagRFP* ORF wurden in das *BamHI/XhoI* Fragment

pSec63-mRFP-PTS_{Ptc5}

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pSM1960. Der *mRFP* ORF wurde um die letzten 13 Codons (inkl. Stopp) des *ptc5* ORFs erweitert, indem die Oligonukleotide MJ333 und MJ334 aneinander gelagert wurden und in das *BamHI/HindIII*-Fragment von pSM1960 inseriert wurden.

MJ333: **g**atccAACCCGGAGGCAACAACAAAGC
CAAAACCTAGATTATGAA

MJ334: **a**gctTTCATAATCTAGGTTTTGGCTTTG
TTGTTGCCTCCGGGTT**g**

von pTEF1-Ptc5¹⁻²⁰¹-tagRFP-HA durch Gibson Assembly inseriert.

MK874: atctaactaagttttaattacaaggatcc

ATGTTGGTGCTAGGGTCTC

MK875: ttaattcagacat

TAATCTTGCATCTTTGCCTC

MK876: GATGCAAGATTA

atgtctgaattaattaaagaaaatagc

MJ223: siehe pTEF1-Ptc5-tagRFP

pTEF1-Dpi8-tagRFP-PTS_{Dpi8}

Analog zu pTEF1-Dpi8-tagRFP, allerdings wurde der *tagRFP* ORF am 5' Ende um die letzten 13 Codons (inkl. Stopp) des *rml2* ORFs erweitert.

MK878, MK879, MK880: Siehe pTEF1-Dpi8-tagRFP

MK881: aagcgtgacataactaattacatgactcgagCTACAAC

TTGGCGCGTGAGCCAAGTGTCTTCTG

GTAGCtttatgacctaatttagatggtaaatc

Im nachfolgenden Teil sind die Oligonukleotide für die Konstrukte zur Herstellung von Deletions- und Insertionsmutanten von *U. maydis* und *S. cerevisiae* dargestellt. Für die Herstellung der endogenen C-terminalen GFP-Fusionen von Ptc5 wurde die Kassette von pMF5-1n bzw. pMF5-1n-GFP-PTS_{Ptc5} benutzt. Das Ligationsprodukt von Kassette sowie rechter und linker Flanke wurde durch PCR vervielfältigt und direkt transformiert.

Mutanten von *S. cerevisiae* wurden mit den Kassetten von Janke *et al* (2004) oder Renicke *et al* (2017) erzeugt. Die Flanken für die homologe Rekombination waren Teil der für die PCR der Kassette verwendeten Oligonukleotide.

U. maydis Mutanten*ptc5-egfp*Linke Flanke

Fw: ACGCAGAAGAGCGCCTACGAGAGC

Rev: GCTCACCATGGTGGCCGCGTTGGCCGCA
AGCTTGGCTTTGATCGGGGACG

Rechte Flanke

Fw: TGCGGCCGCATTAATAGGCCTGAGTGGCC
CTACATAAAAGACAGCTTGTT

Rev: TTCGGAAGGTCTGACTGGCAC

*ptc5-egfp-pts*Linke Flanke

Fw: ACGCAGAAGAGCGCCTACGAGAGC

Rev: GCTCACCATGGTGGCCGCGTTGGCCGCA
AGCTTGGCTTTGATCGGGGACG

Rechte Flanke

Fw: TGCGGCCGCATTAATAGGCCTGAGTGGC
CCTACATAAAAGACAGCTTGTT

Rev: TTCGGAAGGTCTGACTGGCAC

S. cerevisiae Mutanten*tim50-cfp*

Fw: acgccttatttgaagaggaaaagaaaagaagaagattg
 ctgaatccaaaCGTACGCTGCAGGTCGAC
 Rev: tacacacatagatacgtagatacatgagaagagggtt
 acatgaaaattaATCGATGAATTCGAGCTCG

P_{ADHI}-gfp-sps19

Fw: acacttttagagttgggaggtcgatgttcgagtc
 ggatactCGTACGCTGCAGGTCGAC
 Rev: agaaccctcagtaacgaattgccgtccaaagtgttg
 ctgtattCATCGATGAATTCTCTGTCG

ant1-yfp

Fw: tcttttttctaaagcacaacggacaacgcaagctggct
 tccactCGTACGCTGCAGGTCGAC
 Rev: tgagaatccttactattactgaataagcacattgcgtt
 tagaatATCGATGAATTCGAGCTCG

Gpd1-GFP

Fw: caatgaagaacctgccggacatgattgaagaattagat
 ctacatgaagatCGTACGCTGCAGGTCGAC
 Rev: cgaaaaaagtggggaaagtatgatgttatctttctc
 caataaatctaATCGATGAATTCGAGCTCG

4.4 Mikrobiologische Methoden**4.4.1 Transformation von *E. coli***

Für die Transformation des *E. coli*-Stamms Top Ten wurde ein modifiziertes Protokoll nach Hanahan *et al.*, 1991 verwendet. 100 ml einer bei Raumtemperatur in SOB-Medium gewachsenen Kultur mit einer OD₅₅₀ von ungefähr 0,4 wurden pelletiert (4000 Upm, 10 min, 4°C). Die Zellen wurden anschließend in einem Drittel des Ausgangsvolumens in eiskaltem CCMB80-Puffer aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension wieder pelletiert (4000 Upm, 10 min, 4°C) und in einem Zwölftel des Ausgangsvolumens resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 75 µl Portionen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

CCMB80-Puffer

10 mM KOAc pH 7.0
 80 mM CaCl₂*2H₂O
 20 mM MnCl₂*4H₂O
 10 mM MgCl₂*6H₂O
 10% (v/v) Glycerin
 in H₂O_{bid}; pH 6,4

Zur Transformation wurden die Zellen für etwa 5 min auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1-10 µl gelöster Plasmid-DNA bzw. mit einem Ligationsansatz gemischt. Nach 15minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen 90 sec bei 42°C aufgewärmt. Anschließend wurde die Suspension direkt auf dYT-Festmedium mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.4.2 Transformation von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae wurde in YPD bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 kultiviert. Es wurden die Zellen einer 20 ml Kultur geerntet (2.000 Upm, 3 min) und in sterilem H₂O_{bid} gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml SORB äquilibriert, erneut abzentrifugiert und in 180 µl SORB aufgenommen. Dann wurden 20 µl einer denaturierten DNA-Lösung (10 mg/ml *salmon sperm* DNA) zugegeben. Die so behandelten Zellen wurden direkt transformiert oder bei 80°C mehrere Monate aufbewahrt.

SORB

100 mM Lithium-Acetat
1 mM Na₂-EDTA
1 M Sorbitol
in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; sterilfiltriert

PEG

100 mM Lithium-Acetat
1 mM Na₂-EDTA
40% PEG3350
in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; sterilfiltriert

Für die Transformation wurden 50 µl kompetente Zellen mit bis zu 10 µl Plasmid-Lösung (etwa 1 µg DNA) und 300 µl PEG für 30 min bei RT inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 15-30 min bei 42°C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (2.000 Upm, 3 min). Bei Selektion durch Auxotrophie wurden die Zellen in H₂O_{bid} resuspendiert und auf entsprechendes SC-Selektionsmedium ausplattiert. Für eine antibiotika-vermittelte Selektion wurden die Zellen in 1 ml YPD resuspendiert und nach vierstündiger Inkubation bei 30°C wurde der Transformationsansatz auf entsprechendes YPD-Medium ausgestrichen. Anschließend wurden die Platten zwei bis vier Tage bei 30°C inkubiert und genomische Integrationsereignisse wurden durch PCR-Analyse überprüft.

4.4.3 Transformation von *U. maydis*

Die Transformation von *U. maydis* erfolgte gemäß eines modifizierten Protokolls nach Schulz *et al.*, 1990. 50 ml einer *U. maydis* Kultur mit einer optischen Dichte zwischen 0,5 und 1 wurde für 5 min bei 3000 Upm pelletiert und einmal in 20 ml SCS-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml SCS mit 20 mg/ml Lysing Enzymes von *T. harzianum* aufgenommen und protoplastiert. Nachdem etwa 80% der Zellen anprotoplastiert waren, wurden 25 ml eiskalte SCS-Lösung zugegeben und die entstehende Zellsuspension für 10 min bei 2300 Upm pelletiert (4°C). Die Zellen wurden weitere zweimal mit eiskalter SCS-Lösung gewaschen, um Reste der Enzyme zu entfernen. Danach wurden die Zellen einmal mit eiskalter STC-Lösung gewaschen und anschließend in 0,5 ml STC-Lösung aufgenommen und in Portionen von 50 µl aufgeteilt. Diese Protoplasten wurden entweder direkt transformiert oder bei -80°C für eine spätere Verwendung aufbewahrt.

SCS-Lösung

1 M Sorbitol
in 20 mM Na-Citrat
pH 5,8; sterilfiltriert

STC-Lösung

100 mM CaCl₂
1 M Sorbitol in 10 mM Tris-HCl
pH 7,5; sterilfiltriert

STC/PEG-Lösung

40% PEG4000 in STC;
sterilfiltriert

Regenerations-Ager

Top: 1 M Sorbitol in YEPS_{light}
1,5% (w/v) Bactoagar
Bottom: wie Top, zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum

Zur Transformation von *U. maydis* wurden 50 µl der auf Eis getauten Protoplastensuspension mit 100 ng bis zu 5 µg linearisierter DNA mit einem Volumen von maximal 10 µl vorsichtig vermischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml STC/PEG-Lösung zugegeben und die entstehende Suspension für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension auf Regenerations-Agar aufgebracht, der kurz zuvor mit 10 ml Top-Agar ohne Antibiotikum überschichtet wurde. Der Bottom-Agar enthält daher doppelt so viel Antibiotika wie normales Selektionsmedium. Die Regenerations-Agar Platten wurden für drei

bis sieben Tage bei 30°C oder bei Raumtemperatur inkubiert. Einzelkolonien wurden dann auf Selektionsmedium vereinzelt und danach mit PCR und/oder Southern-Analyse untersucht.

4.4.4 Wachstumstests von *S. cerevisiae* auf Festmedium

Für die Untersuchung von Wachstumsphänotypen wurden logarithmisch wachsende *S. cerevisiae* Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 1 angepasst, die in entsprechendem SC-Medium kultiviert waren. Die Zellen wurden anschließend einmal mit H₂O_{bid} gewaschen und in serieller Verdünnung ausgehend von einer OD₆₀₀ von 1 auf Festmedien mit einem Volumen von 5 µl getropft und für zwei bis vier Tage bei 30°C inkubiert.

4.5 Genetische Methoden

4.5.1 Deletion von Genen oder Genfragmenten mittels homologer Rekombination

Zur Deletion von Genen oder von Genfragmenten wurde eine Strategie nach Kämper, 2004 verwendet. 1000 bp flankierende, homologe Regionen dienen in *U. maydis* der zielgerichteten Integration von DNA (z.B. Resistenzkassetten) an einen bestimmten Ort ins Genom durch homologe Rekombination, vorausgesetzt man kann auf dieses relativ seltene Ereignis selektionieren. Um Gene oder Genfragmente zu entfernen wurden Konstrukte hergestellt, die eine Resistenzkassette enthielten und links und rechts von genau der Sequenz eingerahmt waren, die den zu deletierenden Bereich im Genom von *U. maydis* flankiert. Resistenzkassette und flankierende Sequenzen wurden mittels SfiI geschnitten (Bestanteil der Oligonukleotide) und direktional ligiert. Diese Ligationsprodukte wurden mit PCR amplifiziert und entweder direkt transformiert oder aber in den Klonierungsvektor pJet1.2 (Fermentas) inseriert und vor der Transformation sequenziert. Alle verwendeten Kassetten finden sich in Brachmann *et al*, 2004 und enthalten flankierende SfiI-Schnittstellen.

4.5.2 Integration von Konstrukten in den *ip*-Locus von *U. maydis*

Die Aminosäuresubstitution Histidin zu Leucin an der Position 257 der Succinatdehydrogenase (Sdh1; Um1172) führt in *U. maydis* zur Ausprägung einer Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Carboxin (Broomfield & Hargreaves, 1992). Diese Mutation kann genutzt

werden, um gezielt Konstrukte in den *sdh1*-Locus zu integrieren (*ip*-Locus). Linearisiert man ein Plasmid, das *sdh1* in mutierter Version beinhaltet, innerhalb des *sdh1* Leserahmens und transformiert dieses Plasmid in Anwesenheit von Carboxin in *U. maydis* so erhält man Stämme mit einem integrierten Plasmid, das von einer mutierten Version von *sdh1* (*ip^r*) und einer nativen Version von *sdh1* (*ip^s*) flankiert wird. Diese Strategie erlaubt folglich die ortsspezifische Integration beliebiger DNA; allerdings integrieren die Konstrukte häufig mehrfach hintereinander. Mittels Southern Analyse kann anschließend die Integrationshäufigkeit ermittelt werden.

4.6 Molekularbiologische Methoden

4.6.1 Restriktion und Dephosphorylierung von DNA

DNA wurde mit Restriktionsenzymen (Fermentas oder NEB) je nach Applikation zwischen 10 min und 14 Stunden nach Herstellerangaben geschnitten. Dabei wurden zwischen 0,2 und 5 µg DNA eingesetzt. Für Klonierungen wurden häufig geschnittene Vektoren vor der Gelelektrophorese noch für etwa eine halbe Stunde bei 37°C dephosphoryliert.

4.6.2 Ligation von DNA

Ligationsreaktionen wurden entweder über Nacht bei 16°C oder für ungefähr 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (T4-DNA Ligase; Roche). Bei der Insertion von DNA-Fragmenten in geöffnete Vektoren wurde ein mindestens zweifacher molarer Überschuss der jeweiligen Fragmente eingesetzt. Falls die Vektoren mit stumpfen Enden vorlagen, wurde ein mindestens fünffacher Überschuss der zu inserierenden DNA-Fragmente verwendet. Für die Ligation von drei Fragmenten wurden alle drei Fragmente in äquimolarer Konzentration verwendet. Ligationsansätze hatten ein Volumen zwischen 10 µl und 50 µl und es wurden zwischen 50 ng und 5 µg DNA eingesetzt.

4.6.3 Gibson Assembly

Das Zusammenfügen mehrerer DNA-Fragmente mit terminalen Überhängen erfolgte nach der Methode von Gibson *et al.*, 2009. Der verwendete Reaktionsmix (1,33-fach) wurde freundlicherweise von der AG Waldminghaus (SYNMIKRO) zur Verfügung gestellt.

4.6.4 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Zwischen 750 ng und 1,5 µg DNA (je nach Größe) und 2 µl eines entsprechenden Oligonukleotids (10 µM) wurden in einem Gesamtvolumen von 17 µl vereinigt und zur Weiterverarbeitung an die Firma Eurofins MWG Operon geschickt.

4.6.5 Agarosegel-Elektrophorese

DNA wurde zwischen 80 V und 150 V in 1x TAE-Gelen (0,8-1,5% Agarose) aufgetrennt. Den Gelen wurde nach dem Aufkochen Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugesetzt. DNA wurde vor der Beladung mit 10x Auftragspuffer vermischt. Als Größenstandard diente der GeneRuler™ DNA-Ladder Mix (Fermentas).

50x TAE-Puffer

2M Tris-Base
2M Acetat
50mM Na₂-EDTA
in H₂O_{bid}

10x DNA-Auftragspuffer

0,2% (w/v) Orange G
50% (w/v) Saccharose
1 mM Na₂-EDTA
in H₂O_{bid}

4.6.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionen (Mullis *et al.*, 1992; Saiki *et al.*, 1985, 1988) wurden mit Hilfe eines TPersonel Thermocyclers (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten kleiner als 1000 bp oder zur Überprüfung von Mutanten wurde die Phusion Polymerase (~2000 bp/min, NEB) verwendet. Für größere Fragmente wurde entweder die Phusion Polymerase oder

die KOD Extreme Polymerase (1000 bp/min; Merck) verwendet. PCR-Reaktionen gliederten sich in eine initiale Denaturierung gefolgt von 32 Zyklen bestehend aus Denaturierung, Annealing (Anlagerung der einzelsträngigen Oligonukleotide) und Elongation. Teilweise wurde am Ende noch eine finale Elongation von 5 min durchgeführt. Unten sind PCR-Programme für die jeweiligen Polymerasen dargestellt. Die Elongationszeiten wurden in Abhängigkeit der Geschwindigkeit der verwendeten Polymerasen und der Größe der zu amplifizierenden DNA gewählt. Annealing-Temperaturen waren abhängig von dem GC-Gehalt der verwendeten Oligonukleotide.

Phusion-Polymerase

zwischen 1 ng und 300 ng Matrizen-DNA

250 µM dNTPs (1:1:1:1 Verhältnis)

1 µM Oligonukleotid 1

1 µM Oligonukleotid 2

1 x konzentrierter Phusion GC-Puffer (Finnzymes)

0,5 U Phusion-Polymerase

0-5 µl DMSO

Programm: 98°C/1 min – (98°C/30 s - 50-65°C/15 s - 72°C/ x min) x 32 - 72°C/5 min

(Ansatz zwischen 20 und 50 µl)

KOD Extreme Polymerase

zwischen 1 ng und 300 ng Matrizen-DNA

250 µM dNTPs (1:1:1:1 Verhältnis)

1 µM Oligonukleotid 1

1 µM Oligonukleotid 2

1 x konzentrierter KOD-Puffer (Novagen)

1 U KOD-Extreme Polymerase

Programm: 94°C/2 min – (94°C/30 s - 50-65°C/15 s - 68°C/x min) x 32- 68°C/10 min

4.6.7 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Für die Präparation von Plasmid DNA wurde das ZR-Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben verwendet. Gelöste DNA wurde bei -20°C gelagert.

4.6.8 Isolierung von genomischer DNA aus *U. maydis*

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Hoffman & Winston, 1987. 2 ml einer Übernachtskultur in YEPS wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß pelletiert (13000 Upm, 1 min) und das Pellet wurde mit 0,3g Glasperlen, 500 µl Ustilago-Lysepuffer und 500 µl Phenol/Chloroform überschichtet. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) aufgeschlossen und anschließend 10 min

zentrifugiert (13.000 Upm). 400 µl des Überstands wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 20 min) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, für 5 min an der Luft getrocknet und in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Gelöste DNA wurde bei -20°C gelagert.

Ustilago-Lysepuffer

10 mM Tris/HCl pH8,0
100 mM NaCl
1 mM Na₂-EDTA
1 % (w/v) SDS
2 % (w/v) Triton X-100

Phenol/ Chloroform

50 % (v/v) Phenol
50 % (v/v) Chloroform

4.6.9 Transfer und Nachweis von DNA auf Membranen (Southern Blot)

Zur Detektion von spezifischen DNA Fragmenten bei der Überprüfung von *U. maydis* Mutanten wurde die enzymatisch geschnittene DNA auf positiv geladene Nylonmembranen übertragen (Southern, 1992). Zunächst wurde genomische *U. maydis* DNA mit einem entsprechenden Restriktionsenzym (um z.B. die DNA von Mutanten und Wildtypstämmen zu unterscheiden) geschnitten und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde zunächst 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um Purine abzuspalten. Anschließend wurde das Gel in 0,4 M NaOH überführt und für 20 min geschwenkt. Der Transfer der DNA aus dem Gel auf die Nylonmembran (Roth) erfolgte über Kapillarkräfte. Aus einem Tank mit 0,4 M NaOH wurde mit Whatman-Papier und Papierhandtüchern ein Sog durch Gel und Membran erzeugt. Der Transfer erfolgte für mindestens vier Stunden, meistens aber über Nacht. Die auf der Nylonmembran fixierte DNA wurde mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert (Church & Gilbert, 1984). Geeignete Sonden wurden mit Hilfe des Amersham Megaprime DNA Labeling Systems (GE-Healthcare, Freiburg) nach Herstellerangaben synthetisiert. Dazu wurden 5 µl α-³²P-dCTP verwendet (Hartmann Analytic, Braunschweig). Die Membran wurde zunächst 20 min bei 60°C in 15 ml Southern-Hybridisierungspuffer inkubiert. Die Sonde wurde 5 min bei 95°C denaturiert und hinzugegeben (Endkonzentration ca. 10⁶ cpm/ml) und die Membran über Nacht bei 60°C weiter inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal mit 15 ml Southern-Waschpuffer für 30 min gewaschen. Zur Detektion der Signale wurde die getrocknete Membran in Plastikfolie eingeschweißt und für vier bis 24 Stunden in einer Phosphorimager

Kassette (GE-Healthcare) exponiert. Die Detektion der Signale erfolgte mit Hilfe eines Phosphoimagers (Storm860, GE-Healthcare).

Southern-Hybridisierungspuffer

7 % (w/v) SDS

500 mM Natriumphosphat Puffer pH 7,0

Southern-Waschpuffer

1 % (w/v) SDS

100 mM Natriumphosphat Puffer pH 7,0

4.7 Biochemische Methoden

Während der Arbeit mit Proteinen, Membranextrakten, SDS-Polyacrylamidgelen sowie PVDF-Membranen wurden zum Schutz der Proben stets Nitril-Handschuhe getragen.

4.7.1 Isolierung von denaturierten Proteinen aus *U. maydis*

U. maydis Zellen wurden in YEPS bis zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen und 10 ml dieser Kultur pelletiert (3.500 Upm, 5 min). Anschließend wurden die Zellen in 500 µl Thorner-Puffer aufgenommen, resuspendiert und in einem 2 ml Reaktionsgefäß für 5 min bei 95°C erhitzt. Nach Zugabe von 0,1 g Glasperlen wurden die Proben für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach erneutem Erhitzen (5 min, 95°C) wurden die Proben abzentrifugiert (13.000 Upm, 1 min) und 5 – 20 µl des Überstandes für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. Alternativ wurden die Präparationen bei –80°C eingefroren und vor der Verwendung erneut erhitzt (5 min, 95°C) und abzentrifugiert (13.000 Upm, 1 min).

Thorner-Puffer

8 M Urea,

5% (w/v) SDS

0.1 mM Na₂-EDTA

0.01% (w/v) Bromphenolblau,

50 mM Dithiothreitol (kurz vor Verwendung)

in 100 mM Tris-HCl, pH 6,8

4.7.2 Isolierung nativer Proteine aus *U. maydis*

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus *U. maydis* wurden 10 - 50 ml einer in YEPS gezogenen Flüssigkultur ($OD_{600} = 1$) abzentrifugiert (3000 Upm, 5 min), das Pellet mit 10 ml TBS-Puffer gewaschen und erneut abzentrifugiert (3000 Upm, 5 min). Anschließend wurde das Pellet in 500 µl TBS aufgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Zellsuspension wurden 0,3 g Glasperlen, 5 µl 10 % Triton X-100 und 5 µl Protease Inhibitor Cocktail für Pilze (Sigma-Aldrich) zugesetzt und die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder mindestens eine Stunde bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden mit einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) für 10 min bei 4°C aufgeschlossen und Zellbestandteile abzentrifugiert (13000 Upm, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei -80°C.

TBS

50 mM Tris/HCl pH7,5
150 mM NaCl

4.7.3 Isolierung denaturierter Proteine aus *S. cerevisiae*

Proteinextrakte von *S. cerevisiae* wurden nach dem Protokoll von Kushnirov (2000) hergestellt. Zellkulturen wurden in YPD oder entsprechendem SC-Medium angezogen. 1 ml der logarithmisch wachsenden Kultur wurde abzentrifugiert (13000 Upm, 1 min), in einer 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung resuspendiert und 5 min inkubiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert, mit SDS-Probenpuffer (siehe 4.7.5) versetzt und schüttelnd bei 95°C für 5 min inkubiert. Extrahierte Proteine wurden durch eine weitere Zentrifugation (13000 Upm, 1 min) von Zellresten getrennt und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei -80°C.

4.7.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach einer modifizierten Methode nach Bradford, 1976 ermittelt. Dazu wurde die Bio-Rad Protein Assay Reagenz (Bio-Rad) nach Herstellerangaben verwendet.

4.7.5 Elektrophorese von Proteinen

Für die Auftrennung von Proteinen wurde eine Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli, 1970 angewendet. Proteine erhalten durch Bindung an SDS eine negative Ladung, was die Auftrennung in einem elektrischen Feld erlaubt. Die Herstellung und Elektrophorese der Polyacrylamid-Gele erfolgte mit dem Mini Protean System von Bio-Rad. In einigen Fällen wurden 7,5% Criterion™ TGX™ Precast Midi Protein Gele (Bio-Rad) verwendet. Die Gelkammern wurden für die Elektrophorese mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Gele setzten sich aus Sammelgel und Trenngel zusammen. Das Sammelgel dient der Konzentrierung der Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel. Im Trenngel werden die Proteine nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Die Molekülmasse der aufgetragenen Proteine wurde durch ein Proteinstandardgemisch (10 - 180 kD; PageRuler Prestained Protein Ladder; Fermentas) bestimmt. Die Auftrennung erfolgte bei 25 mA je Gel. Vor dem Beladen wurden die Proteinproben mit der entsprechenden Menge fünffachem SDS-Probenpuffer versetzt. Für die Herstellung von Phostag-Gelen wurde dem Trenngel zusätzlich 5 mM Phos-tag™ Acrylamid (AAL-107, Nard Institute Ltd., Hyogo, Japan) und 10 mM Magnesiumchlorid beigemischt.

SDS-Laufpuffer

200 mM Glycin
0,2% (w/v) SDS
in 25 mM Tris-HCl, pH 8,8

SDS-Probenpuffer

2% (w/v) SDS
6% (v/v) Glycerin
0.025% (w/v) Bromphenolblau
50 mM Dithiothreitol
in 50 mM Tris-HCl, pH 6.8

Sammelgel

5% (v/v) Acrylamid
0,1% (w/v) SDS
in 125 mM Tris-HCl, pH 6,8
0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat
0,05% (v/v) TEMED

Trenngel

6 - 12% (v/v) Acrylamid
0,1% (w/v) SDS
in 375 mM Tris-HCl, pH 8,8
0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat
0,05% (v/v) TEMED

4.7.6 Transfer und Nachweis von Proteinen (Western Blot)

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Semi-Dry Blot Apparatur (Peqlab, Erlangen) auf eine PVDF-Membran (Roth) übertragen. Die Membran wurde vor der Verwendung kurz mit Methanol aktiviert. Drei Lagen in Western-Transfer-Puffer getränktem Whatman-Papier wurden auf die Anode der Apparatur gelegt, gefolgt von der aktivierten Membran, dem Gel und drei weiteren Lagen in Western-Transfer-Puffer getränktem Whatman-Papier. Daraufhin wurde dieser Stapel mit einem Plastikroller geglättet um Luftblasen zu entfernen. Der Deckel wurde fest angeschraubt um gleichmäßigen Kontakt des Stapels mit beiden Elektroden zu gewährleisten und die Proteine wurden für 2 h bei 75 mA je Gel auf die PVDF-Membran transferiert.

Western-Transfer-Puffer

200 mM Glycin
20% (v/v) Methanol
in 25 mM Tris-HCl, pH 10,4

Die auf die PVDF-Membran überführten Proteine wurden mit Hilfe von Antikörpern detektiert. Zunächst wurde die Membran in Blockierlösung (5% Milchpulver in TBS-T) 20 min bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Zur parallelen Detektion unterschiedlicher Proteine wurde die Membran der Breite nach in Streifen geschnitten, falls die Auftrennung der entsprechenden Proteine hoch genug war. Anschließend wurden die primären Antikörper (in Blockierlösung) zugegeben über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen und danach der sekundäre HRP (*horse raddish peroxidase*) gekoppelte Antikörper in einer 1:10000 Verdünnung in Blockierlösung zugefügt und für 45 min mit der Membran schwenkend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (siehe oben) wurde der Western Blot ausgelesen. Zur Entwicklung wurde die Membran mit Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben inkubiert. Dazu wurde ein kleiner Autoklavierbeutel möglichst glatt auf eine Arbeitsoberfläche geklebt und die frisch hergestellte Lösung in kleinen Tropfen darauf verteilt. Die mit Proteinen beladene Seite der Membran wurde anschließend vorsichtig auf die Tropfen gelegt und für 5 min inkubiert. Das SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) wurde nach Herstellerangaben eingesetzt, falls ein sehr schwaches Signal zu erwarten war. Anschließend wurde die Membran zwischen die Hälften eines aufgeschnittenen Autoklavierbeutels gelegt und die Signale wurden mit einem Chemocam

Imaging System (Intas; Göttingen) aufgenommen und mit ImageJ ausgewertet (Yang Yu *et al*, 2011).

TBS-T

0,1 % (v/v) Tween 20 in TBS

Primäre Antikörper

Anti-GFP (Torrey Pines, San Diego; 1:5000)

Anti-Por1 (R. Lill, pers. Mitteilung; 1:1000)

Anti-tagRFP (Evrogen, Moskau; 1:1000)

Anti-HA 16B12 (Abcam, Cambridge; 1:2500)

Sekundäre Antikörper

Ziege-Anti-Maus-HRP (Santa Cruz, Dallas)

Ziege-Anti-Kaninchen-HRP (Santa Cruz)

4.7.7 Subzelluläre Fraktionierung

Die biochemische Analyse der Proteinlokalisierung mittels Dichtegradienten-Zentrifugation wurde nach einem modifizierten Protokoll von Cramer *et al.* (2015) durchgeführt. Zunächst wurde ein „post nuclear supernatant“ (PNS) gewonnen, indem die Schritte 1 – 16 des Protokolls abgearbeitet wurden. Anschließend wurde die Konzentration des PNS durch Zugabe von Lysis-Puffer auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und Portionen von 300 µl wurden bei -80°C gelagert oder direkt auf einen Dichtegradienten geladen. Der Dichtegradient bestand aus 333 µl 35%, 666 µl 30%, 666 µl 25% und 333 µl 20% NycoDenz (gelöst in Gradientenbuffer A), das in 3 ml Polycarbonat Zentrifugenröhrchen (Beckman Coulter, Brea) vorsichtig übereinander geschichtet wurde. Anschließend wurde der Gradient mit 200 µl des jeweiligen PNS überschichtet und in einer Beckman L7-65 Ultrazentrifuge ausgestattet mit einem Sorvall TST 60.4 Schwenkrotor zentrifugiert (35000 Upm, 90 min, 4°C). Dann wurden 12 Fraktionen mit einer Mikropipette vorsichtig vom oberen Ende des Gradienten abgenommen und mit einer entsprechenden Menge Protein-Probenpuffer versetzt. Der Gradientenpuffer enthielt kein EDTA, wenn Fraktionen anschließend auf Phostag-Gele geladen wurden.

Die Extraktion peripherer Membranproteine erfolgte nach dem Protokoll von Fujiki *et al.* (1982). Membranpräparationen wurden mit frisch angesetztem 100 mM Natriumcarbonat pH 11 (gelöst in Lysispuffer) für 15 min auf Eis inkubiert. Als Kontrolle diente ein unbehandeltes Aliquot. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 13000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Protein-Probenpuffer resuspendiert, während das Membranpellet mit Thorner-Puffer (siehe 4.7.1) versetzt wurde.

Lysis-Puffer

0,5 mM Na₂-EDTA
1 mM KCl
0,6 M Sorbitol
Protease-Inhibitoren:
1 µg/mL Antipain
1 µg/mL Aprotinin
0,2 mg/mL Benzamidine hydrochlorid
1 µg/mL Bestatin
1 µg/mL Chymostatin
1 µg/mL Leupeptin
0,2 mg/mL NaF
1 µg/mL Pepstatin
10 µg/mL PMSF

Gradientenpuffer A (ohne Sucrose)

1 mM Na₂-EDTA
1 mM KCl
0.1 % (v/v) ethanol
in 5 mM MES; pH 6, eingestellt mit KOH

DTT Puffer

10 mM Dithiotreitol (direkt vor Benutzung zugesetzt)
in 100 mM Tris

Sorbitol-Puffer zur Spheroplastierung

1,2 M Sorbitol
in 20 mM MES, pH 7,4

4.7.8 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation von Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA wurden jeweils 10.000 OD₆₀₀ einer logarithmisch wachsenden Kultur des WT oder der *ΔimpI* Mutante bei 6000 Upm für 10 min bei RT pelletiert. Die Pellets wurde in ca. 10 ml Lysispuffer resuspendiert und in einem mit Flüssigstickstoff befüllten Mörser mit einem Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Das Pulver wurde in einem auf Eis gekühlten 50 ml Reaktionsgefäß aufgetaut und der Extrakt wurde bei 3000 Upm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 25 µl Pierce Anti-HA magnetic beads (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben inkubiert. Nach dem finalen Waschschrift wurden die Kugeln in 20 µl Protein-Ladepuffer aufgenommen und bei 95°C für 10 min inkubiert und die Proteine von den Kugeln zu lösen. Die Kugeln wurden vor dem Auftragen auf das Polyacrylamid-Gel durch Zentrifugation entfernt.

Lysispuffer

137 mM NaCl
1% Triton X-100
2 mM Na₂-EDTA
Protease-Inhibitoren:
1 µg/mL Antipain
1 µg/mL Aprotinin

0,2 mg/mL Benzamidine hydrochlorid
1 µg/mL Bestatin
1 µg/mL Chymostatin
1 µg/mL Leupeptin
0,2 mg/mL NaF
1 µg/mL Pepstatin
10 µg/mL PMSF
in 20 mM Tris-HCl, pH 8

4.7.9 Silberfärbung von Proteinen

Die Silberfärbung ermöglicht die Visualisierung von Proteinen nach einer SDS-PAGE. Die Methode basiert auf der Anlagerung von Silberionen an negativ geladenen Seitenketten von Proteinen, welche anschließend durch Reduktion zu elementarem Silber sichtbar gemacht werden. Die Silberfärbung erfolgte nach dem für Massenspektrometrie optimierten Protokoll von Mortz *et al* (2001).

4.7.10 Massenspektrometrie

Nach der Silberfärbung wurden relevante Banden aus dem Gel ausgeschnitten und zerkleinert. Die Stücke wurden mit Lösung A entfärbt, mit Isopropanol dehydratisiert und getrocknet. Nach der Rehydratisierung mit Lösung B wurden die Proben über Nacht bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden sie über C18 *microspin columns* (Nest Group) nach Herstellerangaben entsalzt. Getrocknete und rekonstituierte Peptide wurden mit Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) durch Nutzung eines Q-Exactive Plus Instruments gekoppelt an ein Ultimate 3000 RSLC nano und eine Nanospray Flex Ionenquelle (alle von Thermo Scientific) untersucht. Die Peptide wurden mit einem Ameisensäure/Acetonitril-Gradienten auf einer Umkehrphase HPLC Säule (75 µm x 40 cm, mit C18 Harz gefüllt, 2.4 µm) aufgetrennt. Die MS/MS Daten wurden mit einer Datenbank abgeglichen, welche zusätzlich die Proteinsequenz von Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA enthielt. Der Abgleich erfolgte mit Mascot eingebettet in die Proteom Discoverer 1.4 Software (Thermo Scientific).

Lösung A

30% Isopropanol
60 mM Ammoniumcarbonat
30 mM Thioglykolsäure
in H₂O_{bid}

Lösung B

10% Acetonitril
5 mM Ammoniumhydrogencarbonat
8 mM DTT
2,5 µg/ml Trypsin (Promega)

4.7.11 Immunfluoreszenz

Für die Antikörperfärbung fixierter Zellen wurde 1 ml logarithmisch wachsender Zellen bei 3000 Upm für 3 min pelletiert. Die Zellen wurden in 4% Paraformaldehyd/PBS resuspendiert und 15 min bei RT rollend inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit Phos und zweimal mit Phos/Sorb gewaschen. 500 µl der fixierten Zellen wurden mit 1 µl 1 M beta-Mercaptoethanol und 10 µl 10U/µl Lyticase (Sigma-Aldrich) versetzt und für 30 – 45 min bei RT rollend spheroplastiert. Die Spheroplasten wurden bei 3000 Upm für 3 min pelletiert und zweimal vorsichtig mit Phos/Sorb unter Nutzung einer 1000 µl Pipettenspitze gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 180 µl Phos/Sorb aufgenommen mit 20 µl 10% Triton X-100 versetzt und für 1 min bei RT permeabilisiert. Die Zellen wurden zweimal vorsichtig mit Phos/Sorb gewaschen und in 200 µl Phos/Sorb resuspendiert (1000 µl Pipettenspitze). 100 µl der Suspension wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser (Roth) in einer Feuchtigkeitskammer aufgebracht und viermal mit 1% BSA/PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µl des Primärantikörpers in BSA/PBS aufgebracht und die Deckgläser wurden im 1 h bei RT inkubiert (anti-GFP, 1:500, Torrey Pines Biolabs; anti-HA, 1:250, Abcam). Die Deckgläser wurden fünfmal mit BSA/PBS gewaschen und mit 100 µl Sekundärantikörper in BSA/PBS für 2 h bei RT inkubiert (Alexa Fluor^R 488-anti-Kaninchen und Rhodamine RedTM-X-anti-Maus, 1:400, Jackson ImmunoResearch Laboratories). Die Deckgläser wurden fünfmal mit BSA/PBS gewaschen. Die Waschlösung eines einzelnen Deckglases wurde entfernt, sofort auf einem 76 x 26 mm Deckglas aufgebracht und unverzüglich mikroskopiert. Die restlichen Proben wurden während dessen mit BSA/PBS bedeckt in der Feuchtigkeitskammer gelagert.

Phos

100 mM Kaliumphosphat-Puffer , pH 6, 5

Phos/Sorb

1,2 M Sorbitol
in Phos

4.8 Mikroskopie

Zur Mikroskopie von *U. maydis* oder *S. cerevisiae* Zellen wurde ein Fluoreszenzmikroskop vom Typ Axiovert 200M mit einem Ludel Piezo Drive (Zeiss; Göttingen) verwendet. Als Fluorophore wurden eGFP (Exzitation: 488 nm; Emission: 584 nm), mCherry (Exzitation: 587 nm; Emission: 610 nm), tagRFP (Exzitation: 555 nm; Emission: 610 nm) und myCitrine (Exzitation: 514 nm; Emission: 529 nm) verwendet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3000 Upm für 2 min pelletiert, einmal mit H₂O_{bid} gewaschen und zehn- bis zwanzigfach konzentriert. Anschließend wurden 3 µl auf einen mit einer ca. 0,5 mm dicken Wasseragar-Schicht bedeckten Objektträger (76 x 26 mm) getropft und ein Deckglas (18 x 18 mm) aufgelegt. Der Wasseragar diente der Fixierung der Zellen, um unscharfe Bilder zu vermeiden. Zur Anregung der Fluorophore wurden die zur Wellenlänge passenden Filter benutzt. Für die Aufnahme von Z-Stapeln wurde eine Stapeldicke von 0,5 µm gewählt. Vergleichsfotos wurden im Differentialkontrast aufgenommen. Der Dokumentation dienten eine Kamera des Typs ORCA (Hamamatsu; Japan) und die Software Volocity 5.3. Die Bilder wurden als 16-bit TIFF-Dateien exportiert und mit ImageJ (Schneider *et al*, 2012) analysiert. Die Bestimmung der Proteinlokalisierung erfolgte mit dekonvolvierten Z-Stapeln der entsprechenden Fluoreszenzkanäle. Die für die Dekonvolution benötigten Punktspreizfunktionen (PSF) wurden mit dem ImageJ Plugin „PSF Generator“ unter Verwendung des Richards & Wolf Modells erstellt (Kirshner *et al*, 2013). Die Dekonvolution einzelner Z-Stapel erfolgte anschließend mit dem ImageJ Plugin „DeconvolutionLab“ (Vonesch & Unser, 2008; Richardson-Lucy Algorithmus bei 25 Wiederholungen).

4.8.1 Statistische Auswertung von Mikroskopiebildern

Die Bestimmung des Korrelationseffizienten erfolgte mit Volocity 5.5.2. Ungepaarte t-Tests wurden mit Microsoft Excel 2016 berechnet. Die Graphen in Abbildung 11D und E sowie in Abbildung 16B wurden mit RStudio 1.2.1335 unter R 3.6.0 erstellt (RStudio Team, 2018; R, 2017). Die Balkendiagramme in Abbildung 13 und Abbildung 21 wurden mit Microsoft Excel 2016 generiert. Pro Stamm wurden mindestens drei unabhängige Experimente mit je 5 Bildern ausgewertet. Mit Ausnahme von Abbildung 11E enthielten alle Bilder mindestens zehn oder mehr *S. cerevisiae* oder *U. maydis* Zellen. Die Daten für Abbildung 11E wurden manuell quantifiziert, da eine automatisierte Quantifizierung nicht möglich war. Insgesamt wurden pro Stamm mindestens 73 Zellen ausgewertet, welche ein sichtbares Signal im RFP-Kanal zeigten. Die Auswertung erfolgte einfach-blind. Das ImageJ-Zusatzmodul *Colocalization Threshold* wurde für die Berechnung des Manders Teil-Koeffizienten von mCherry-SKL in Abbildung 19

benutzt. Dieser Faktor beschreibt den Grad der Überlappung von Objekten im roten Kanal mit Objekten im grünen Kanal. Die Quantifizierung der Peroxisomenzahl in Abbildung 19 und Abbildung 21 wurde mit folgendem ImageJ Macro durchgeführt:

```
dirCh1 = getDirectory("Choose Image Directory");

setBatchMode(true);
list1 = getFileList(dirCh1);

Dialog.create("Peroxisome Counter - Set Ball radius");
    Dialog.addNumber("Ball radius:", 3);
    Dialog.addMessage("");
Dialog.show();

BallR = Dialog.getNumber();

Dialog.create("Peroxisome Counter - Set Treshold");
    Dialog.addNumber("Min:", 100);
    Dialog.addNumber("Max:", 2308);
    Dialog.addMessage("");
Dialog.show();

ThrMin = Dialog.getNumber();
ThrMax = Dialog.getNumber();

for (i=0; i<list1.length; i++) {
showProgress(i+1, list1.length);
    open(dirCh1+list1[i]);

run("Set Scale...", "distance=106 known=10 unit=Mu global");
run("Subtract Background...", "rolling=BallR");
setAutoThreshold("Default dark");
//run("Threshold...");
setThreshold(ThrMin, ThrMax);
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Watershed");
run("Set Measurements...", "area shape display redirect=None decimal=3");
run("Analyze Particles...", " display exclude");
}
```

Optimale Werte für die Variablen "Ball radius", "ThrMin" und "ThrMax" wurden vor Nutzung des Macros manuell an einigen Bildern stichprobenartig ermittelt.

4.9 Bioinformatik

Für die Suche und den Vergleich von Sequenzen wurden folgende Datenbanken verwendet: National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov), Pedant Ustilago maydis Data Base (Pedant; http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_t237631_Ust_maydi_v2GB), Saccharomyces Genome Database (SGD; www.yeastgenome.org). Die Analyse von PTS1-Motiven erfolgte mit dem PTS1-Predictor (<http://mendel.imp.ac.at/pts1/>; Neuberger *et al*, 2003a, 2003b). Sequenzvergleiche wurden mit Clustal Omega durchgeführt (Larkin *et al*, 2007).

4.9.1 Identifikation von PTS1 Signalen durch reguläre Ausdrücke

Für sämtliche Analysen wurden Proteinsequenzen im FASTA-Format mit dem Texteditor Notepad++ analysiert. Reguläre Ausdrücke wurden entweder mit der „Such“- oder der „Suchen-und-Ersetzen“-Funktion im Modus „Reguläre Ausdrücke“ verwendet. Proteinsequenzen, welche ein mögliches PTS1 Signal enthielten wurden mit dem Ausdruck „([SA][RK][LI][SA][RK][MFV])*\$“ markiert („Bookmark“-Funktion) und unmarkierte Zeilen wurden entfernt. Weiterführende Analysen wurden im Anschluss manuell durchgeführt. Die Vorhersage von Transmembrandomänen erfolgte mit TMHMM v 2.0, Phobius und TopCons (Sonnhammer *et al*, 1998; Käll *et al*, 2004; Tsirigos *et al*, 2015). Proteindomänen wurden mit dem S.M.A.R.T Server untersucht und die Homologie-Analyse erfolgte mit BLAST (Letunic & Bork, 2018; Altschul *et al*, 1990). Für die Suche von PTS1-Motiven in mitochondrialen Proteinen wurden die Proteom-Daten von Morgenstern *et al* (2017) verwendet (Tabelle S3).

5 Literatur

- Aaltonen MJ, Friedman JR, Osman C, Salin B, di Rago JP, Nunnari J, Langer T & Tatsuta T (2016) MIC OS and phospholipid transfer by Ups2-Mdm35 organize membrane lipid synthesis in mitochondria. *J. Cell Biol.* **213**: 525–534
- Agne B, Meindl NM, Niederhoff K, Einwächter H, Rehling P, Sickmann A, Meyer HE, Girzalsky W & Kunau WH (2003) Pex8p: An intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Mol. Cell* **11**: 635–646

- Ajioka RS, Phillips JD & Kushner JP (2006) Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1763**: 723–736
- Al-Saryi NA, Al-Hejjaj MY, Van Roermund CWT, Hulmes GE, Ekal L, Payton C, Wanders RJA & Hettema EH (2017) Two NAD-linked redox shuttles maintain the peroxisomal redox balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* **7**: 11868
- Albertini M, Rehling P, Erdmann R, Girzalsky W, Kiel JAKW, Veenhuis M & Kunau WH (1997) Pex14p, a peroxisomal membrane protein binding both receptors of the two PTS-dependent import pathways. *Cell* **89**: 83–92
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P (2002) Molecular Biology of the Cell. 2008, New York: Garland Science
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403–410
- Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O & Sinclair DA (2003) Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **423**: 181–185
- Andersson MX, Goksör M & Sandelius AS (2007) Optical manipulation reveals strong attracting forces at membrane contact sites between endoplasmic reticulum and chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **282**: 1170–1174
- Ariño J, Casamayor A & González A (2011) Type 2C protein phosphatases in fungi. *Eukaryot. Cell* **10**: 21–33
- Ast J (2017) Import peroxisomaler Matrixproteine über die *Ustilago maydis* Rezeptoren Pex5a, Pex5b und Pex7.
- Ast J, Stiebler AC, Freitag J & Bölker M (2013) Dual targeting of peroxisomal proteins. *Front. Physiol.* **4**: 297
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K (2010) Current Protocols in Molecular Biology: Preface. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*
- Backes S & Herrmann JM (2017) Protein translocation into the intermembrane space and matrix of mitochondria: Mechanisms and driving forces. *Front. Mol. Biosci.* **4**:
- Bakeeva LE, Chentsov YS & Skulachev VP (1978) Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *BBA - Bioenerg.* **501**: 349–369
- Baldet P, Alban C & Douce R (1997) Biotin synthesis in higher plants: Purification and characterization of bioB gene product equivalent from *Arabidopsis thaliana* overexpressed in *Escherichia coli* and its subcellular localization in pea leaf cells. *FEBS Lett.* **419**: 206–210
- Bartoszewska M, Williams C, Kikhney A, Opaliński Ł, Van Roermund CWT, De Boer R, Veenhuis M & Van Der Klei IJ (2012) Peroxisomal proteostasis involves a lon family protein that functions as protease and chaperone. *J. Biol. Chem.* **287**: 27380–27395

- Baumann S, Pohlmann T, Jungbluth M, Brachmann A & Feldbrügge M (2012) Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mrnps and endosomes. *J. Cell Sci.* **125**: 2740–2752
- Becht P, König J & Feldbrügge M (2006) The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *J. Cell Sci.* **119**: 4964–4973
- Bereiter-Hahn J (1990) Behavior of Mitochondria in the Living Cell. *Int. Rev. Cytol.* **122**: 1–63
- Bereiter-Hahn J & Vöth M (1994) Dynamics of mitochondria in living cells: Shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* **27**: 198–219
- Birschmann I, Stroobants AK, Van Den Berg M, Schäfer A, Rosenkranz K, Kunau WH & Tabak HF (2003) Pex15p of *Saccharomyces cerevisiae* provides a molecular basis for recruitment of the AAA peroxin Pex6p to peroxisomal membranes. *Mol. Biol. Cell* **14**: 2226–2236
- Bleazard W, McCaffery JM, King EJ, Bale S, Mozdy A, Tieu Q, Nunnari J & Shaw JM (1999) The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* **1**: 298–304
- Böhmer C, Böhmer M, Bölker M & Sandrock B (2008) Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 act independently in triggering cytokinesis in *Ustilago maydis*. *J. Cell Sci.* **121**: 143–148
- Bortfeld M, Auffarth K, Kahmann R & Basse CW (2004) The *Ustilago maydis* a2 mating-type locus genes *Iga2* and *rga2* compromise pathogenicity in the absence of the mitochondrial p32 family protein Mrb1. *Plant Cell* **16**: 2233–2248
- Brachmann A, König J, Julius C & Feldbrügge M (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol. Genet. Genomics* **272**: 216–226
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254
- Breitling R, Sharif O, Hartman ML & Krisans SK (2002) Loss of compartmentalization causes misregulation of lysine biosynthesis in peroxisome-deficient yeast cells. *Eukaryot. Cell* **1**: 978–986
- Broadley SA, Demlow CM & Fox TD (2001) Peripheral Mitochondrial Inner Membrane Protein, Mss2p, Required for Export of the Mitochondrially Coded Cox2p C Tail in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 7663–7672
- Brocard C & Hartig A (2006) Peroxisome targeting signal 1: Is it really a simple tripeptide? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1763**: 1565–1573
- Brocard C, Kragler F, Simon MM, Schuster T & Hartig A (1994) The tetratricopeptide repeat-domain of the PAS10 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for binding the peroxisomal targeting signal-SKL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**: 1016–1022
- Broomfield PLE & Hargreaves JA (1992) A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of

- succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Curr. Genet.* **22**: 117–121
- C.Y. Fan A & C. Young J (2011) Function of Cytosolic Chaperones in Tom70-Mediated Mitochondrial Import. *Protein Pept. Lett.* **18**: 122–131
- Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T & Pfanner N (2009) Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell* **138**: 628–644
- Chacinska A, Pfannschmidt S, Wiedemann N, Kozjak V, Sanjuán Szklarz LK, Schulze-Specking A, Truscott KN, Guiard B, Meisinger C & Pfanner N (2004) Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J.* **23**: 3735–3746
- Changle M, Haslbeck M, Babujee L, Jahn O & Reumann S (2006) Identification and characterization of a stress-inducible and a constitutive small heat-shock protein targeted to the matrix of plant peroxisomes. *Plant Physiol.* **141**: 47–60
- Cheng A, Ross KE, Kaldis P & Solomon MJ (1999) Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes Dev.* **13**: 2946–2957
- Church GM & Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1991–1995
- Collinge AJ & Markham P (1985) Woronin bodies rapidly plug septal pores of severed *Penicillium chrysogenum* hyphae. *Exp. Mycol.* **9**: 80–85
- Conrad MN & Newlon CS (1982) The regulation of mitochondrial DNA levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **6**: 147–152
- Cormack BP, Valdivia RH & Falkow S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). In *Gene* pp 33–38.
- Corneo G, Moore C, Rao Sanadi D, Grossman LI & Marmur J (1966) Mitochondrial DNA in yeast and some mammalian species. *Science (80-.)*. **151**: 687–689
- Cramer J, Effelsberg D, Girzalsky W & Erdmann R (2015) Small-scale purification of peroxisomes for analytical applications. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2015**: 838–845
- Cregg JM, Van Klei IJ, Sulter GJ, Veenhuis M & Harder W (1990) Peroxisome-deficient mutants of *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **6**: 87–97
- Currie E, Guo X, Christiano R, Chitraju C, Kory N, Harrison K, Haas J, Walther TC & Farese R V. (2014) High confidence proteomic analysis of yeast LDs identifies additional droplet proteins and reveals connections to dolichol synthesis and sterol acetylation. *J. Lipid Res.* **55**: 1465–1477
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR & Abrams SR (2010) Absciscic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 651–679

- Dammai V & Subramani S (2001) The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* **105**: 187–196
- Das AK, Helps NR, Cohen PT & Barford D (1996) Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J.*
- Delmaghani S, Defourny J, Aghaie A, Beurg M, Dulon D, Thelen N, Perfettini I, Zelles T, Aller M, Meyer A, Emptoz A, Giraudet F, Leibovici M, Darteville S, Soubigou G, Thiry M, Vizi ES, Safieddine S, Hardelin JP, Avan P, et al (2015) Hypervulnerability to Sound Exposure through Impaired Adaptive Proliferation of Peroxisomes. *Cell* **163**: 894–906
- Distel B, Erdmann R, Gould SJ, Blobel G, Crane DI, Cregg JM, Dodt G, Fujiki Y, Goodman JM, Just WW, Kiel JAKW, Kunau WH, Lazarow PB, Mannaerts GP, Moser HW, Osumi T, Rachubinski RA, Roscher A, Subramani S, Tabak HF, et al (1996) A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *J. Cell Biol.* **135**: 1–3
- Dixit E, Boulant S, Zhang Y, Lee ASY, Odendall C, Shum B, Hacohen N, Chen ZJ, Whelan SP, Fransen M, Nibert ML, Superti-Furga G & Kagan JC (2010) Peroxisomes Are Signaling Platforms for Antiviral Innate Immunity. *Cell* **141**: 668–681
- Doehlemann G, Van Der Linde K, Aßmann D, Schwammbach D, Hof A, Mohanty A, Jackson D & Kahmann R (2009) Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog.* **5**:
- de Duve C (1969) Evolution of the Peroxisome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **168**: 369–381
- De Duve C (2007) The origin of eukaryotes: A reappraisal. *Nat. Rev. Genet.* **8**: 395–403
- De Duve C & Baudhuin P (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* **46**: 323–357
- Eisenberg-Bord M, Shai N, Schuldiner M & Bohnert M (2016) A Tether Is a Tether Is a Tether: Tethering at Membrane Contact Sites. *Dev. Cell* **39**: 395–409
- Elbaz-Alon Y, Rosenfeld-Gur E, Shinder V, Futerman AH, Geiger T & Schuldiner M (2014) A dynamic interface between vacuoles and mitochondria in yeast. *Dev. Cell* **30**: 95–102
- Elgersma Y, van Roermund CW, Wanders RJ & Tabak HF (1995) Peroxisomal and mitochondrial carnitine acetyltransferases of *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single gene. *EMBO J.* **14**: 3472–3479
- Emerman AB, Zhang Z-R, Chakrabarti O & Hegde RS (2010) Trehalose Is a Key Determinant of the Quiescent Metabolic State That Fuels Cell Cycle Progression upon Return to Growth. *Mol. Biol. Cell* **21**: 4325–4337
- Endo T, Yamamoto H & Esaki M (2003) Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles. *J. Cell Sci.* **116**: 3259–3267
- Erdmann R & Blobel G (1996) Identification of Pex13p, a peroxisomal membrane receptor for the PTS1

- recognition factor. *J. Cell Biol.* **135**: 111–121
- Erdmann R, Veenhuis M, Mertens D & Kunau WH (1989) Isolation of peroxisome-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**: 5419–5423
- Esser K, Jan PS, Pratje E & Michaelis G (2004) The mitochondrial IMP peptidase of yeast: Functional analysis of domains and identification of Gut2 as a new natural substrate. *Mol. Genet. Genomics* **271**: 616–626
- Esser K, Pratje E & Michaelis G (1996) SOM1, a small new gene required for mitochondrial inner membrane peptidase function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **252**: 437–445
- Esser K, Tursun B, Ingenhoven M, Michaelis G & Pratje E (2002) A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease Pcp1. *J. Mol. Biol.* **323**: 835–843
- Fagarasanu A, Fagarasanu M, Eitzen GA, Aitchison JD & Rachubinski RA (2006) The Peroxisomal Membrane Protein Inp2p Is the Peroxisome-Specific Receptor for the Myosin V Motor Myo2p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev. Cell* **10**: 587–600
- Falkenberg M, Larsson N-G & Gustafsson CM (2007) DNA Replication and Transcription in Mammalian Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 679–699
- Fan J, Li X, Issop L, Culty M & Papadopoulos V (2016) ACBD2/ECI2-mediated peroxisome-mitochondria interactions in leydig cell steroid biosynthesis. *Mol. Endocrinol.* **30**: 763–782
- Faust JE, Verma A, Peng C & Mcnew JA (2012) An inventory of peroxisomal proteins and pathways in *Drosophila melanogaster*. *Traffic* **13**: 1378–1392
- Feldheim D, Rothblatt J & Schekman R (1992) Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 3288–3296
- Ferdinandusse S, Denis S, Faust PL & Wanders RJA (2009) Bile acids: The role of peroxisomes. *J. Lipid Res.* **50**: 2139–2147
- Foury F, Roganti T, Lecrenier N & Purnelle B (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **440**: 325–331
- Freitag J, Ast J & Bölker M (2012) Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi. *Nature* **485**: 522–525
- Freitag J, Ast J, Linne U, Stehlik T, Martorana D, Bölker M & Sandrock B (2014) Peroxisomes contribute to biosynthesis of extracellular glycolipids in fungi. *Mol. Microbiol.* **93**: 24–36
- Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J & Voeltz GK (2011) ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science (80-.).* **334**: 358–362

- Fujiki Y, Hubbard L, Fowler S & Lazarow PB (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: Application to Endoplasmic Reticulum. *J. Cell Biol.* **93**: 97–102
- Gabaldón T, Snel B, van Zimmeren F, Hemrika W, Tabak H & Huynen MA (2006) Origin and evolution of the peroxisomal proteome. *Biol. Direct* **1**: 8
- Gao H, Metz J, Teanby NA, Ward AD, Botchway SW, Coles B, Pollard MR & Sparkes I (2016) In vivo quantification of peroxisome tethering to chloroplasts in tobacco epidermal cells using optical tweezers. *Plant Physiol.* **170**: 263–272
- Gatto GJ, Geisbrecht B V., Gould SJ & Berg JM (2000) Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 1091–1095
- Geissler A, Chacinska A, Truscott KN, Wiedemann N, Brandner K, Sickmann A, Meyer HE, Meisinger C, Pfanner N & Rehling P (2002) The mitochondrial presequence translocase: An essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell* **111**: 507–518
- Gey U, Czupalla C, Hoflack B, Rödel G & Krause-Buchholz U (2008) Yeast pyruvate dehydrogenase complex is regulated by a concerted activity of two kinases and two phosphatases. *J. Biol. Chem.* **283**: 9759–9767
- Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA & Smith HO (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6**: 343–345
- Glick BS, Brandt A, Cunningham K, Müller S, Hallberg RL & Schatz G (1992) Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* **69**: 809–822
- Glover JR, Andrews DW & Rachubinski RA (1994) *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 10541–10545
- Goffeau A, Barrell G, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H & Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science* (80-.). **274**: 546–567
- Gonzalez NH, Felsner G, Schramm FD, Klingl A, Maier UG & Bolte K (2011) A single peroxisomal targeting signal mediates matrix protein import in diatoms. *PLoS One* **6**:
- Goodman JM, Scott CW, Donahue PN & Atherton JP (1984) Alcohol oxidase assembles post-translationally into the peroxisome of *Candida boidinii*. *J. Biol. Chem.* **259**: 8485–8493
- Gould SJ, Kalish JE, Morrell JC, Bjorkman J, Urquhart AJ & Crane DI (1996) Pex13p is an SH3 protein of the peroxisome membrane and a docking factor for the predominantly cytoplasmic PTS1 receptor. *J. Cell Biol.* **135**: 85–95
- Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J & Subramani S (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J. Cell Biol.* **108**: 1657–1664

- Gould SJ, Keller GA, Schneider M, Howell SH, Garrard LJ, Goodman JM, Distel B, Tabak H & Subramani S (1990) Peroxisomal protein import is conserved between yeast, plants, insects and mammals. *EMBO J.* **9**: 85–90
- Gray MW, Burger G & Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science (80-.).* **283**: 1476–1481
- Guo X, Niemi NM, Coon JJ & Pagliarini DJ (2017) Integrative proteomics and biochemical analyses define Ptc6p as the *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate dehydrogenase phosphatase. *J. Biol. Chem.* **292**: 11751–11759
- Gurvitz A, Rottensteiner H, Kilpeläinen SH, Hartig A, Hiltunen JK, Binder M, Dawes IW & Hamilton B (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal 2,4-dienoyl-coA reductase is encoded by the oleate-inducible gene SPS19. *J. Biol. Chem.* **272**: 22140–22147
- Hall RM, Nagley P & Linnane AW (1976) Biogenesis of mitochondria - XLII. Genetic analysis of the control of cellular mitochondrial DNA levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *MGG Mol. Gen. Genet.* **145**: 169–175
- Hanahan D, Jessee J & Bloom FR (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* **204**: 63–113
- Hansen KG, Aviram N, Laborenz J, Bibi C, Meyer M, Spang A, Schuldiner M & Herrmann JM (2018) An ER surface retrieval pathway safeguards the import of mitochondrial membrane proteins in yeast. *Science (80-.).* **361**: 1118–1122
- Haselbeck RJ & McAlister-Henn L (1991) Isolation, nucleotide sequence, and disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding mitochondrial NADP(H)-specific isocitrate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **266**: 2339–2345
- Haselbeck RJ & McAlister-Henn L (1993) Function and expression of yeast mitochondrial NAD- and NADP-specific isocitrate dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **268**: 12116–12122
- Henke B, Girzalsky W, Berteaux-Lecellier V & Erdmann R (1998) IDP3 encodes a peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase required for the β -oxidation of unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **273**: 3702–3711
- Herrmann GJ, Thatcher JW, Mills JP, Hales KG, Fuller MT, Nunnari J & Shaw JM (1998) Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.* **143**: 359–373
- Herrmann JM & Neupert W (2000) Protein transport into mitochondria. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 210–214
- Herrmann JM & Neupert W (2013) Protein Import into Mitochondria. *Encycl. Biol. Chem. Second Ed.* **66**: 632–636
- Herrmann JM & Riemer J (2010) The intermembrane space of mitochondria. *Antioxidants Redox Signal.* **13**: 1341–1358
- Heymans HSA, Schutgens RBH, Tan R, Van Den Bosch H & Borst P (1983) Severe plasmalogen deficiency in

- tissues of infants without peroxisomes (Zellweger syndrome). *Nature* **306**: 69–70
- Hoepfner D, Van Den Berg M, Philippsen P, Tabak HF & Hettema EH (2001) A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **155**: 979–990
- Hoepfner D, Schildknecht D, Braakman I, Philippsen P & Tabak HF (2005) Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* **122**: 85–95
- Hoffman CS & Winston F (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267–272
- Hohfeld J, Veenhuis M & Kunau WH (1991) PAS3, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis. *J. Cell Biol.* **114**: 1167–1178
- Hönscher C, Mari M, Auffarth K, Bohnert M, Griffith J, Geerts W, van der Laan M, Cabrera M, Reggiori F & Ungermann C (2014) Cellular metabolism regulates contact sites between vacuoles and mitochondria. *Dev. Cell* **30**: 86–94
- Hoogenraad NJ & Ryan MT (2001) Translocation of proteins into mitochondria. *IUBMB Life* **51**: 345–350
- Hoppins S, Collins SR, Cassidy-Stone A, Hummel E, DeVay RM, Lackner LL, Westermann B, Schuldiner M, Weissman JS & Nunnari J (2011) A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J. Cell Biol.* **195**: 323–340
- Hoppins S, Lackner L & Nunnari J (2007) The Machines that Divide and Fuse Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 751–780
- Horvath SE, Rampelt H, Oeljeklaus S, Warscheid B, Van Der Laan M & Pfanner N (2015) Role of membrane contact sites in protein import into mitochondria. *Protein Sci.* **24**: 277–297
- Huhse B, Rehling P, Albertini M, Blank L, Meller K & Kunau WH (1998) Pex17p of *Saccharomyces cerevisiae* is a novel peroxin and component of the peroxisomal protein translocation machinery. *J. Cell Biol.* **140**: 49–60
- Islinger M, Cardoso MJR & Schrader M (2010) Be different-The diversity of peroxisomes in the animal kingdom. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1803**: 881–897
- Islinger M, Li KW, Seitz J, Völkl A & Lüers GH (2009) Hitchhiking of Cu/Zn superoxide dismutase to peroxisomes - Evidence for a natural piggyback import mechanism in mammals. *Traffic* **10**: 1711–1721
- Islinger M, Voelkl A, Fahimi HD & Schrader M (2018) The peroxisome: an update on mysteries 2.0. *Histochem. Cell Biol.* **150**: 443–471
- Jan PS, Esser K, Pratje E & Michaelis G (2000) Som1, a third component of the yeast mitochondrial inner membrane peptidase complex that contains Imp1 and Imp2. *Mol. Gen. Genet.* **263**: 483–491

- Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, Moreno-Borchart A, Doenges G, Schwob E, Schiebel E & Knop M (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**: 947–962
- Jedd G & Chua NH (2000) A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nat. Cell Biol.* **2**: 226–231
- Jendrach M, Mai S, Pohl S, Vöth M & Bereiter-Hahn J (2008) Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion* **8**: 293–304
- Jensen RE & Johnson AE (2001) Opening the door to mitochondrial protein import. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 1008–1010
- Jeong SY & Seol DW (2008) The role of mitochondria in apoptosis. *J. Biochem. Mol. Biol.* **41**: 11–22
- Jiang L, Whiteway M, Ramos CW, Rodriguez-Medina JR & Shen SH (2002) The YHR076w gene encodes a type 2C protein phosphatase and represents the seventh PP2C gene in budding yeast. *FEBS Lett.* **527**: 323–325
- Johnson A, Gin P, Marbois BN, Hsieh EJ, Wu M, Barros MH, Clarke CF & Tzagoloff A (2005) COQ9, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **280**: 31397–31404
- Jones JM, Morrell JC & Gould SJ (2004) PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class I peroxisomal membrane proteins. *J. Cell Biol.* **164**: 57–67
- Jones JM, Nau K, Geraghty MT, Erdmann R & Gould SJ (1999) Identification of peroxisomal Acyl-CoA thioesterases in yeast and humans. *J. Biol. Chem.* **274**: 9216–9223
- Jung S, Marelli M, Rachubinski RA, Goodlett DR & Aitchison JD (2010) Dynamic changes in the subcellular distribution of gpd1p in response to cell stress. *J. Biol. Chem.* **285**: 6739–6749
- Käll L, Krogh A & Sonnhammer ELL (2004) A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J. Mol. Biol.* **338**: 1027–1036
- Kämper J (2004) A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol. Genet. Genomics* **271**: 103–110
- Kämper J, Kahmann R, Bölker M, Ma LJ, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Müller O & others (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**: 97–101
- Kang PJ, Ostermann J, Shilling J, Neupert W, Craig EA & Pfanner N (1990) Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* **348**: 137–143
- Karnik SK & Trelease RN (2005) Arabidopsis peroxin 16 coexists at steady state in peroxisomes and endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* **138**: 1967–1981

- Keller GA, Gould S, Deluca M & Subramani S (1987) Firefly luciferase is targeted to peroxisomes in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**: 3264–3268
- Kim PK & Hettema EH (2015) Multiple pathways for protein transport to peroxisomes. *J. Mol. Biol.* **427**: 1176–1190
- Kim PK, Mullen RT, Schumann U & Lippincott-Schwartz J (2006) The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *J. Cell Biol.* **173**: 521–532
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E & Koike T (2009) Separation and detection of large phosphoproteins using phosphatase-sensitive tag sds-page. *Nat. Protoc.* **4**: 1513–1521
- Kirshner H, Aguet F, Sage D & Unser M (2013) 3-D PSF fitting for fluorescence microscopy: Implementation and localization application. *J. Microsc.* **249**: 13–25
- Klecker T, Scholz D, Förtsch J & Westermann B (2013) The yeast cell cortical protein Numl integrates mitochondrial dynamics into cellular architecture. *J. Cell Sci.* **126**: 2924–2930
- van der Klei IJ & Veenhuis M (2006a) Yeast and filamentous fungi as model organisms in microbody research. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1763**: 1364–1373
- van der Klei IJ & Veenhuis M (2006b) PTS1-independent sorting of peroxisomal matrix proteins by Pex5p. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**: 1794–1800
- van der Klei IJ, Yurimoto H, Sakai Y & Veenhuis M (2006) The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1763**: 1453–1462
- Koehler CM, Merchant S & Schatz G (1999) How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 428–432
- Kojic M & Holloman WK (2000) Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis*. *Can. J. Microbiol.* **46**: 333–338
- Koller A, Snyder WB, Faber KN, Wenzel TJ, Rangell L, Keller GA & Subramani S (1999) Pex22p of *Pichia pastoris*, essential for peroxisomal matrix protein import, anchors the ubiquitin-conjugating enzyme, Pex4p, on the peroxisomal membrane. *J. Cell Biol.* **146**: 99–112
- Kornmann B, Currie E, Collins SR, Schuldiner M, Nunnari J, Weissman JS & Walter P (2009) An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science (80-.)*. **325**: 477–481
- Krause-Buchholz U, Gey U, Wünschmann J, Becker S & Rödel G (2006) YIL042c and YOR090c encode the kinase and phosphatase of the *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate dehydrogenase complex. *FEBS Lett.* **580**: 2553–2560
- Krisans SK, Thompson SL, Pena LA, Kok E & Javitt NB (1985) Bile acid synthesis in rat liver peroxisomes: Metabolism of 26-hydroxycholesterol to 3 β -hydroxy-5-cholenoic acid. *J. Lipid Res.* **26**: 1324–1332

- Krogh A, Larsson B, Von Heijne G & Sonnhammer ELL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**: 567–580
- Kunze M, Pracharoenwattana I, Smith SM & Hartig A (2006) A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1763**: 1441–1452
- Kushnirov V V. (2000) Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* **16**: 857–860
- Labrousse AM, Zappaterra MD, Rube DA & Van der Blik AM (1999) C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Cell* **4**: 815–826
- Lackner LL, Ping H, Graef M, Murley A & Nunnari J (2013) Endoplasmic reticulum-associated mitochondria-cortex tether functions in the distribution and inheritance of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**:
- Laemmli UK (1970) Denaturing (SDS) discontinuous gel electrophoresis. *Nature* **227**: 680–685
- Lahiri S, Chao JT, Tavassoli S, Wong AKO, Choudhary V, Young BP, Loewen CJR & Prinz WA (2014) A Conserved Endoplasmic Reticulum Membrane Protein Complex (EMC) Facilitates Phospholipid Transfer from the ER to Mitochondria. *PLoS Biol.* **12**:
- Lammers T & Lavi S (2007) Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation and in cellular stress signaling. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42**: 437–461
- Landau EM & Kwanbunbumpen S (1969) Morphology of motor nerve terminals subjected to polarizing currents [17]. *Nature* **221**: 271–272
- Lane N & Martin W (2010) The energetics of genome complexity. *Nature* **467**: 928–928
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ & Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947–2948
- Lazarow PB (2006) Chapter 3.1.7. The import receptor Pex7p and the PTS2 targeting sequence. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1763**: 1599–1604
- Lee YJ, Jeschke GR, Roelants FM, Thorner J & Turk BE (2012) Reciprocal Phosphorylation of Yeast Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenases in Adaptation to Distinct Types of Stress. *Mol. Cell. Biol.* **32**: 4705–4717
- Leighton F, Poole B, Beaufay H, Baudhuin P, Coffey JW, Fowler S & De Duve C (1968) The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria, and lysosomes from the livers of rats injected with triton WR-1339. Improved isolation procedures, automated analysis, biochemical and morphological properties of fractions. *J. Cell Biol.* **37**: 482–513
- Letunic I & Bork P (2018) 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* **46**: D493–D496

- Lewin AS, Hines V & Small GM (1990) Citrate synthase encoded by the CIT2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is peroxisomal. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 1399–1405
- Lill R (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**: 831–838
- Lindén M, Andersson G, Gellerfors P & Nelson BD (1984) Subcellular distribution of rat liver porin. *BBA - Biomembr.* **770**: 93–96
- Liu H, Tan X, Veenhuis M, McCollum D & Cregg JM (1992) An efficient screen for peroxisome-deficient mutants of *Pichia pastoris*. *J. Bacteriol.* **174**: 4943–4951
- Luo W, Chen X, Fang H & Green N (2003) Factors governing nonoverlapping substrate specificity by mitochondrial inner membrane peptidase. *J. Biol. Chem.* **278**: 4943–4948
- Luo W, Fang H & Green N (2006) Substrate specificity of inner membrane peptidase in yeast mitochondria. *Mol. Genet. Genomics* **275**: 431–436
- Magliano P, Flipphi M, Arpat BA, Delessert S & Poirier Y (2011) Contributions of the peroxisome and β -oxidation cycle to biotin synthesis in fungi. *J. Biol. Chem.* **286**: 42133–42140
- Manford AG, Stefan CJ, Yuan HL, MacGurn JA & Emr SD (2012) ER-to-Plasma Membrane Tethering Proteins Regulate Cell Signaling and ER Morphology. *Dev. Cell* **23**: 1129–1140
- Manning G, Plowman GD, Hunter T & Sudarsanam S (2002) Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* **27**: 514–520
- Marshall PA, Krimkevich YI, Lark RH, Dyer JM, Veenhuis M & Goodman JM (1995) Pmp27 promotes peroxisomal proliferation. *J. Cell Biol.* **129**: 345–355
- Matsumoto N, Tamura S & Fujiki Y (2003) The pathogenic peroxin Pex26p recruits the Pex1p-Pex6p AAA ATPase complexes to peroxisomes. *Nat. Cell Biol.* **5**: 454–460
- Mattiazzi Ušaj M, Brložnik M, Kaferle P, Žitnik M, Wolinski H, Leitner F, Kohlwein SD, Zupan B & Petrovič U (2015) Genome-wide localization study of yeast pex11 identifies peroxisome-mitochondria interactions through the ERMES complex. *J. Mol. Biol.* **427**: 2072–2087
- Mayerhofer PU (2016) Targeting and insertion of peroxisomal membrane proteins: ER trafficking versus direct delivery to peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1863**: 870–880
- McNew JA & Goodman JM (1994) An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *J. Cell Biol.* **127**: 1245–1257
- Meinecke M, Cizmowski C, Schliebs W, Krüger V, Beck S, Wagner R & Erdmann R (2010) The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nat. Cell Biol.* **12**: 273–277
- Merzlyak EM, Goedhart J, Shcherbo D, Bulina ME, Shcheglov AS, Fradkov AF, Gaintzeva A, Lukyanov KA,

- Lukyanov S, Gadella TWJ & Chudakov DM (2007) Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat. Methods* **4**: 555–557
- Metzger MB, Maurer MJ, Dancy BM & Michaelis S (2008) Degradation of a cytosolic protein requires endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *J. Biol. Chem.* **283**: 32302–32316
- Michail Woronin (1864) Zur Entwicklungsgeschichte des *Ascobolus pulcherrimus* Cr. und *Pezizen*. Senckenbergische Naturforschende Gesellschaft
- Mihara K & Sato R (1985) Molecular cloning and sequencing of cDNA for yeast porin, an outer mitochondrial membrane protein: a search for targeting signal in the primary structure. *EMBO J.* **4**: 769–774
- Miyata N, Watanabe Y, Tamura Y, Endo T & Kuge O (2016) Phosphatidylserine transport by Ups2-Mdm35 in respiration-active mitochondria. *J. Cell Biol.* **214**: 77–88
- Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen J V., Hjerrild M, Wisniewski JR, Stahl E, Bolouri MS, Ray HN, Sihag S, Kamal M, Patterson N, Lander ES & Mann M (2003) Integrated Analysis of Protein Composition, Tissue Diversity, and Gene Regulation in Mouse Mitochondria. *Cell* **115**: 629–640
- Morgenstern M, Stiller SB, Lübbert P, Peikert CD, Dannenmaier S, Drepper F, Weill U, Höß P, Feuerstein R, Gebert M, Bohnert M, van der Laan M, Schuldiner M, Schütze C, Oeljeklaus S, Pfanner N, Wiedemann N & Warscheid B (2017) Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. *Cell Rep.* **19**: 2836–2852
- Mortimer RK & Johnston JR (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**: 35–43
- Mortz E, Krogh TN, Vorum H & Görg A (2001) Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics* **1**: 1359–1363
- Motley AM & Hettema EH (2007) Yeast peroxisomes multiply by growth and division. *J. Cell Biol.* **178**: 399–410
- Motley AM, Hettema EH, Ketting R, Plasterk R & Tabak HF (2000) *Caenorhabditis elegans* has a single pathway to target matrix proteins to peroxisomes. *EMBO Rep.* **1**: 40–46
- Müller WH, Van Der Krift TP, Krouwer AJJ, Wösten HAB, Van Der Voort LHM, Smaal EB & Verkleij AJ (1991) Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J.* **10**: 489–495
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Erlich H (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* **24**: 17–27
- Naamati A, Regev-Rudzki N, Galperin S, Lill R & Pines O (2009) Dual targeting of Nfs1 and discovery of its

- novel processing enzyme, Icp55. *J. Biol. Chem.* **284**: 30200–30208
- Nagotu S, Saraya R, Otzen M, Veenhuis M & van der Klei IJ (2008) Peroxisome proliferation in *Hansenula polymorpha* requires Dnm1p which mediates fission but not de novo formation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1783**: 760–769
- Naoé M, Ohwa Y, Ishikawa D, Ohshima C, Nishikawa SI, Yamamoto H & Endo T (2004) Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. *J. Biol. Chem.* **279**: 47815–47821
- Neuberger G, Kunze M, Eisenhaber F, Berger J, Hartig A & Brocard C (2004) Hidden localization motifs: naturally occurring peroxisomal targeting signals in non-peroxisomal proteins. *Genome Biol.* **5**: R97
- Neuberger G, Maurer-Stroh S, Eisenhaber B, Hartig A & Eisenhaber F (2003a) Prediction of peroxisomal targeting signal 1 containing proteins from amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **328**: 581–592
- Neuberger G, Maurer-Stroh S, Eisenhaber B, Hartig A & Eisenhaber F (2003b) Motif refinement of the peroxisomal targeting signal 1 and evaluation of taxon-specific differences. *J. Mol. Biol.* **328**: 567–579
- Nguyen TT, Lewandowska A, Choi JY, Markgraf DF, Junker M, Bilgin M, Ejsing CS, Voelker DR, Rapoport TA & Shaw JM (2012) Gem1 and ERMES Do Not Directly Affect Phosphatidylserine Transport from ER to Mitochondria or Mitochondrial Inheritance. *Traffic* **13**: 880–890
- Nötzel C, Lingner T, Klingenberg H & Thoms S (2016) Identification of New Fungal Peroxisomal Matrix Proteins and Revision of the PTS1 Consensus. *Traffic* **17**: 1110–1124
- Nuebel E, Manganas P & Tokatlidis K (2016) Orphan proteins of unknown function in the mitochondrial intermembrane space proteome: New pathways and metabolic cross-talk. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1863**: 2613–2623
- Nunnari J, Fox TD & Walter P (1993) A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science (80-.)*. **262**: 1997–2004
- Osman C, Merkwirth C & Langer T (2009) Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *J. Cell Sci.* **122**: 3823–3830
- Otzen M, Perband U, Wang D, Baerends RJS, Kunau WH, Veenhuis M & Van Der Klei IJ (2004) *Hansenula polymorpha* Pex19p Is Essential for the Formation of Functional Peroxisomal Membranes. *J. Biol. Chem.* **279**: 19181–19190
- Palmieri L, Rottensteiner H, Girzalsky W, Scarcia P, Palmieri F & Erdmann R (2001) Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *EMBO J.* **20**: 5049–5059
- Pan C & Mason TL (1997) Functional analysis of ribosomal protein L2 in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **272**: 8165–8171
- Petrova VY, Drescher D, Kujumdzieva A V. & Schmitt MJ (2004) Dual targeting of yeast catalase A to

- peroxisomes and mitochondria. *Biochem. J.* **380**: 393–400
- Pfanner N & Geissler A (2001) Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 339–349
- Ping HA, Kraft LM, Chen WT, Nilles AE & Lackner LL (2016) Num1 anchors mitochondria to the plasma membrane via two domains with different lipid binding specificities. *J. Cell Biol.* **213**: 513–524
- Platta HW, Grunau S, Rosenkranz K, Girzalsky W & Erdmann R (2005) Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. *Nat. Cell Biol.* **7**: 817–822
- Platta HW, El Magraoui F, Schlee D, Grunau S, Girzalsky W & Erdmann R (2007) Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. *J. Cell Biol.* **177**: 197–204
- Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T & Hiltunen JK (2006) Peroxisomal β -oxidation-A metabolic pathway with multiple functions. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1763**: 1413–1426
- Poulos A, Singh H, Paton B, Sharp P & Derwas N (1986) Accumulation and defective β -oxidation of very long chain fatty acids in Zellweger's syndrome, adrenoleukodystrophy and Refsum's disease variants. *Clin. Genet.* **29**: 397–408
- Preuss D, Mulholland J, Kaiser CA, Orlean P, Albright C, Rose MD, Robbins PW & Botstein D (1991) Structure of the yeast endoplasmic reticulum: Localization of ER proteins using immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Yeast* **7**: 891–911
- Ptacek J, Devgan G, Michaud G, Zhu H, Zhu X, Fasolo J, Guo H, Jona G, Breitkreutz A, Sopko R, McCartney RR, Schmidt MC, Rachidi N, Lee SJ, Mah AS, Meng L, Stark MJR, Stern DF, De Virgilio C, Tyers M, et al (2005) Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* **438**: 679–684
- Purdue PE, Yang X & Lazarow PB (1998) Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway. *J. Cell Biol.* **143**: 1859–1869
- R (CoreTeam) (2017) R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Raffaello A, Mammucari C, Gherardi G & Rizzuto R (2016) Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. *Trends Biochem. Sci.* **41**: 1035–1049
- Rainey RN, Glavin JD, Chen H-W, French SW, Teitell MA & Koehler CM (2006) A New Function in Translocation for the Mitochondrial i-AAA Protease Yme1: Import of Polynucleotide Phosphorylase into the Intermembrane Space. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 8488–8497
- Regev-Rudzki N, Karniely S, Ben-Haim NN & Pines O (2005) Yeast aconitase in two locations and two metabolic pathways: Seeing small amounts is believing. *Mol. Biol. Cell* **16**: 4163–4171
- Renicke C, Allmann AK, Lutz AP, Heimerl T & Taxis C (2017) The mitotic exit network regulates spindle pole body selection during sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **206**: 919–937

- Renicke C, Schuster D, Usherenko S, Essen LO & Taxis C (2013a) A LOV2 domain-based optogenetic tool to control protein degradation and cellular function. *Chem. Biol.* **20**: 619–626
- Renicke C, Spadaccini R & Taxis C (2013b) A Tobacco Etch Virus Protease with Increased Substrate Tolerance at the P1' position. *PLoS One* **8**:
- Rhodin JAG (1954) Correlation of Ultrastructural Organization: And Function in Normal and Experimentally Changed Proximal Convolute Tubule Cells of the Mouse Kidney: an Electron Microscopic Study Stockholm : Dept. of Anatomy, Karolinska Institutet
- van Roermund CWT, Drissen R, van den Berg M, Ijlst L, Hettema EH, Tabak HF, Waterham HR & Wanders RJA (2001) Identification of a Peroxisomal ATP Carrier Required for Medium-Chain Fatty Acid -Oxidation and Normal Peroxisome Proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 4321–4329
- Van Roermund CWT, Hettema EH, Kal AJ, Van Den Berg M, Tabak HF & Wanders RJA (1998) Peroxisomal β -oxidation of polyunsaturated fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*: Isocitrate dehydrogenase provides NADPH for reduction of double bonds at even positions. *EMBO J.* **17**: 677–687
- Rothblatt JA, Deshaies RJ, Sanders SL, Daum G & Schekman R (1989) Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J. Cell Biol.* **109**: 2641–2652
- Rottensteiner H, Kramer A, Lorenzen S, Stein K, Landgraf C, Volkmer-Engert R & Erdmann R (2004) Peroxisomal membrane proteins contain common Pex19p-binding sites that are an integral part of their targeting signals. *Mol. Biol. Cell* **15**: 3406–3417
- RStudio Team (2018) RStudio: Integrated Development Environment for R.
- Ruan H, Yan Z, Sun H & Jiang L (2007) The YCR079w gene confers a rapamycin-resistant function and encodes the sixth type 2C protein phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **7**: 209–215
- Rucktäschel R, Girzalsky W & Erdmann R (2011) Protein import machineries of peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1808**: 892–900
- Rymer Ł, Kempniński B, Chelstowska A & Skoneczny M (2018) The budding yeast Pex5p receptor directs Fox2p and Cta1p into peroxisomes via its N-terminal region near the FxxxW domain. *J. Cell Sci.* **131**:
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (80-.).* **239**: 487–491
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA & Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (80-.).* **230**: 1350–1354
- Sambrook J & Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3th edn, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, Argentine J (ed) Cold Spring Harbor Laboratory Press

- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463–5467
- Schatz G (1963) The isolation of possible mitochondrial precursor structures from aerobically grown baker's yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **12**: 448–451
- Schatz G & Dobberstein B (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* (80-.). **271**: 1519–1526
- Schleyer M & Neupert W (1985) Transport of proteins into mitochondria: Translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. *Cell* **43**: 339–350
- Schliebs W & Kunau WH (2006) PTS2 Co-receptors: Diverse proteins with common features. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1763**: 1605–1612
- Schlüter A, Fourcade S, Ripp R, Mandel JL, Poch O & Pujol A (2006) The evolutionary origin of peroxisomes: An ER-peroxisome connection. *Mol. Biol. Evol.* **23**: 838–845
- Schneider CA, Rasband WS & Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**: 671–675
- Schneider HC, Berthold J, Bauer MF, Dietmeier K, Guiard B, Brunner M & Neupert W (1994) Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature* **371**: 768–774
- Schrader M, Bonekamp NA & Islinger M (2012) Fission and proliferation of peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1822**: 1343–1357
- Schulz B, Banuett F, Dahl M, Schlesinger R, Schäfer W, Martin T, Herskowitz I & Kahmann R (1990) The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**: 295–306
- Schweighofer A, Hirt H & Meskiene I (2004) Plant PP2C phosphatases: Emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci.* **9**: 236–243
- Scorrano L, De Matteis MA, Emr S, Giordano F, Hajnóczky G, Kornmann B, Lackner LL, Levine TP, Pellegrini L, Reinisch K, Rizzuto R, Simmen T, Stenmark H, Ungermann C & Schuldiner M (2019) Coming together to define membrane contact sites. *Nat. Commun.* **10**:
- Sena E, Welch J & Fogel S (1976) Nuclear and mitochondrial DNA replication during zygote formation and maturation in yeast. *Science* (80-.). **194**: 433–435
- Sesaki H, Southard SM, Yaffe MP & Jensen RE (2003) Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Biol. Cell* **14**: 2342–2356
- Shai N, Yifrach E, Van Roermund CWT, Cohen N, Bibi C, Ijlst L, Cavellini L, Meurisse J, Schuster R, Zada L, Mari MC, Reggiori FM, Hughes AL, Escobar-Henriques M, Cohen MM, Waterham HR, Wanders RJA,

- Schuldiner M & Zalckvar E (2018) Systematic mapping of contact sites reveals tethers and a function for the peroxisome-mitochondria contact. *Nat. Commun.* **9**:
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL & Van der Bliek AM (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **12**: 2245–2256
- Smith JJ & Aitchison JD (2013) Peroxisomes take shape. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**: 803–817
- Sonnhammer EL, von Heijne G & Krogh A (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc. 8th Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.*
- Southern EM (1992) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. 1975. *Biotechnology* **24**: 122–139
- Spellig T, Bottin A & Kahmann R (1996) Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* **252**: 503–509
- Spröte P, Brakhage AA & Hynes MJ (2009) Contribution of peroxisomes to penicillin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **8**: 421–423
- Stehlik T, Sandrock B, Ast J & Freitag J (2014) Fungal peroxisomes as biosynthetic organelles. *Curr. Opin. Microbiol.* **22**: 8–14
- Stein I, Peleg Y, Even-Ram S & Pines O (1994) The single translation product of the FUM1 gene (fumarase) is processed in mitochondria before being distributed between the cytosol and mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 4770–4778
- Stewart MQ, Esposito RD, Gowani J & Goodman JM (2001) Alcohol oxidase and dihydroxyacetone synthase, the abundant peroxisomal proteins of methylotrophic yeasts, assemble in different cellular compartments. *J. Cell Sci.* **114**: 2863–2868
- Stiebler AC, Freitag J, Schink KO, Stehlik T, Tillmann BAM, Ast J & Bölker M (2014) Ribosomal Readthrough at a Short UGA Stop Codon Context Triggers Dual Localization of Metabolic Enzymes in Fungi and Animals. *PLoS Genet.* **10**: 1–9
- Strijbis K, van den Burg J, Visser WF, van den Berg M & Distel B (2012) Alternative splicing directs dual localization of *Candida albicans* 6-phosphogluconate dehydrogenase to cytosol and peroxisomes. *FEMS Yeast Res.* **12**: 61–68
- Sugiura A, Mattie S, Prudent J & McBride HM (2017) Newly born peroxisomes are a hybrid of mitochondrial and ER-derived pre-peroxisomes. *Nature* **542**: 251–254
- Tabak HF, Hoepfner D, Zand A v d, Geuze HJ, Braakman I & Huynen MA (2006) Formation of peroxisomes: Present and past. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1763**: 1647–1654
- Tabak HF, van der Zand A & Braakman I (2008) Peroxisomes: minted by the ER. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**: 393–

400

- Tamura Y, Onguka O, Aiken Hobbs AE, Jensen RE, Iijima M, Claypool SM & Sesaki H (2012) Role for two conserved intermembrane space proteins, Ups1p and Up2p, in intra-mitochondrial phospholipid trafficking. *J. Biol. Chem.* **287**: 15205–15218
- Tan T, Özbalci C, Brügger B, Rapaport D & Dimmer KS (2013) Mcp1 and Mcp2, two novel proteins involved in mitochondrial lipid homeostasis. *J. Cell Sci.* **126**: 3563–3574
- Tanabe Y, Maruyama JI, Yamaoka S, Yahagi D, Matsuo I, Tsutsumi N & Kitamoto K (2011) Peroxisomes are involved in biotin biosynthesis in *Aspergillus* and *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **286**: 30455–30461
- Tatsuta T, Augustin S, Nolden M, Friedrichs B & Langer T (2007) m-AAA protease-driven membrane dislocation allows intramembrane cleavage by rhomboid in mitochondria. *EMBO J.* **26**: 325–335
- Terlecky SR, Nuttley WM, McCollum D, Sock E & Subramani S (1995) The *Pichia pastoris* peroxisomal protein PAS8p is the receptor for the C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *EMBO J.* **14**: 3627–3634
- Terziyska N, Lutz T, Kozany C, Mokranjac D, Mesecke N, Neupert W, Herrmann JM & Hell K (2005) Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. *FEBS Lett.* **579**: 179–184
- Thoms S & Erdmann R (2005) Dynamin-related proteins and Pex11 proteins in peroxisome division and proliferation. *FEBS J.* **272**: 5169–5181
- Titorenko VI, Nicaud JM, Wang H, Chan H & Rachubinski RA (2002) Acyl-CoA oxidase is imported as a heteropentameric, cofactor-containing complex into peroxisomes of *Yarrowia lipolytica*. *J. Cell Biol.* **156**: 481–494
- Tolbert NE, Oeser A, Kisaki T, Hageman RH & Yamazaki RK (1968) Peroxisomes from spinach leaves containing enzymes related to glycolate metabolism. *J. Biol. Chem.* **243**: 5179–5184
- Trotter PJ, Hagerman RA & Voelker DR (1999) A yeast strain defective in oleic acid utilization has a mutation in the RML2 gene. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1438**: 223–238
- Tsirigos KD, Peters C, Shu N, Käll L & Elofsson A (2015) The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic Acids Res.* **43**: W401–W407
- Ungermann C, Neupert W & Cyr DM (1994) The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science (80-.).* **266**: 1250–1253
- Valm AM, Cohen S, Legant WR, Melunis J, Hershberg U, Wait E, Cohen AR, Davidson MW, Betzig E & Lippincott-Schwartz J (2017) Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature* **546**: 162–167
- Veenhuis M, Mateblowski M, Kunau WH & Harder W (1987) Proliferation of microbodies in *Saccharomyces*

- cerevisiae. *Yeast* **3**: 77–84
- Visser WF, Van Roermund CWT, Ijlst L, Waterham HR & Wanders RJA (2007) Metabolite transport across the peroxisomal membrane. *Biochem. J.* **401**: 365–375
- Vogel F, Bornhövd C, Neupert W & Reichert AS (2006) Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* **175**: 237–247
- Vögtle FN, Burkhart JM, Gonczarowska-Jorge H, Kücükköse C, Taskin AA, Kopczynski D, Ahrends R, Mossmann D, Sickmann A, Zahedi RP & Meisinger C (2017) Landscape of submitochondrial protein distribution. *Nat. Commun.* **8**:
- Vögtle FN, Burkhart JM, Rao S, Gerbeth C, Hinrichs J, Martinou JC, Chacinska A, Sickmann A, Zahedi RP & Meisinger C (2012) Intermembrane space proteome of yeast mitochondria. *Mol. Cell. Proteomics* **11**: 1840–1852
- Voss C, Lahiri S, Young BP, Loewen CJ & Prinz WA (2012) ER-shaping proteins facilitate lipid exchange between the ER and mitochondria in *S. cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **125**: 4791–4799
- Wach A, Brachat A, Pöhlmann R & Philippsen P (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793–1808
- Walton PA, Hill P & Subramani S (1995) Import of stably-folded proteins into peroxisomes. *Mol Cell Biol* **6**: 675–683
- Wanders RJA & Waterham HR (2006) Biochemistry of Mammalian Peroxisomes Revisited. *Annu. Rev. Biochem.* **75**: 295–332
- Wang D, Visser N V., Veenhuis M & Van der Klei IJ (2003) Physical Interactions of the Peroxisomal Targeting Signal 1 Receptor Pex5p, Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **278**: 43340–43345
- Wang H, Sreenivasan U, Hu H, Saladino A, Polster BM, Lund LM, Gong DW, Stanley WC & Sztalryd C (2011) Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *J. Lipid Res.* **52**: 2159–2168
- Van Weeghel M, Ofman R, Argmann CA, Ruiter JPN, Claessen N, Oussoren S V., Wanders RJA, Aten J & Houten SM (2014) Identification and characterization of Eci3, a murine kidney-specific Δ^3, Δ^2 -enoyl-CoA isomerase. *FASEB J.* **28**: 1365–1374
- Westermann B (2014) Mitochondrial inheritance in yeast. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1837**: 1039–1046
- Whalley NA, Walters S & Hammond K (2018) Molecular Cell Biology Macmillan
- Wiedemann N & Pfanner N (2017) Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* **86**: 685–714

- Williams CC, Jan CH & Weissman JS (2014) Targeting and plasticity of mitochondrial proteins revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science* (80-.). **346**: 748–751
- Winzler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connelly C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Gentalen E, Giaever G, et al (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* (80-.). **285**: 901–906
- Yan M, Rachubinski DA, Joshi S, Rachubinski RA & Subramani S (2008) Dysferlin domain-containing proteins, Pex30p and Pex31p, localized to two compartments, control the number and size of oleate-induced peroxisomes in *Pichia pastoris*. *Mol. Biol. Cell* **19**: 885–898
- Yang Yu B, Elbukun C, Ren CL & Huissoon JP (2011) Image processing and classification algorithm for yeast cell morphology in a microfluidic chip. *J. Biomed. Opt.* **16**: 066008
- Yofe I, Weill U, Meurer M, Chuartzman S, Zalckvar E, Goldman O, Ben-Dor S, Schütze C, Wiedemann N, Knop M, Khmelinskii A & Schuldiner M (2016) One library to make them all: Streamlining the creation of yeast libraries via a SWAp-Tag strategy. *Nat. Methods* **13**: 371–378
- Yu T, Robotham JL & Yoon Y (2006) Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 2653–2658
- Van Der Zand A, Gent J, Braakman I & Tabak HF (2012) Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes. *Cell* **149**: 397–409
- Zimmermann R, Eyrich S, Ahmad M & Helms V (2011) Protein translocation across the ER membrane. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1808**: 912–924

Danksagung

Zunächst möchte ich Michael Bölker für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen und für die enorme Freiheit bei der Verwirklichung eigener Ideen. Außerdem geht mein Dank an Uwe Maier für das Erstellen eines zweiten Gutachtens. Zudem danke ich Roland Lill und Christof Taxis für ihre Bereitschaft der Prüfungskommission anzugehören. Besonderer Dank gilt Johannes Freitag für die tolle wissenschaftliche Zusammenarbeit, zahlreichen Diskussionen, die Korrektur dieser Arbeit und unzählige Tipps

rund ums molekularbiologische Arbeiten. Bedanken möchte ich mich bei ihm und seiner ganzen Familie ebenfalls für die schöne Zeit außerhalb des Labors.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der AG Bölker, AG Mösch und AG Taxis danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre und die entspannenden Pausen, oftmals begleitet von dem ein oder anderen Kuchenstück oder einer Tasse Kaffee. Mein besonderer Dank gilt Julia, Alina, Björn und Johannes für die wissenschaftliche Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Peroxisomen. Danken möchte ich auch Christof und Christian für die zahlreichen Tipps im IT-Bereich, bei der Fluoreszenzmikroskopie sowie für die Bereitstellung einiger Hefe-Plasmide. Bei Roland Lill und Chris Meisinger bedanke ich mich für die zur Verfügung gestellten Antiseren. Marisa danke ich herzlich für die tolle Organisation des Labors, die Herstellung unzähliger Medien und Lösungen und für ihre Hilfsbereitschaft außerhalb des Labors, wie das Aufräumen des Sozialraums und das Bestellen der Getränke. Bei Birgit und Markus Hildenberg möchte ich mich für alle kleinen und großen Dinge außerhalb des Laboralltags bedanken. Besonderer Dank gilt Govert und Isolde für ihren unermüdlichen Einsatz in der Spülküche. Weder Spitzen stecken zu müssen noch Pipetten oder Gefäße autoklavieren zu müssen stellt eine enorme Arbeitsentlastung und einen oft unterschätzten Luxus dar. Maya Schuldiner danke ich für die Möglichkeit sechs Wochen lang in ihrem Labor am Weizmann Institute of Science zu arbeiten und zu lernen und das wunderschöne Land Israel kennenzulernen. Der gesamten AG Schuldiner danke ich ferner für ihre Gastfreundschaft, Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit in Rehovot.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, ohne deren Unterstützung und Beistand diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Meinem Vater Gerhard und meiner Mutter Carola danke ich herzlich für die Finanzierung meines Bachelor- und Masterstudiums. Meinem Bruder Carsten danke ich für das häufige Musizieren in entspannter Atmosphäre, bei dem ich für einige Stunden dem Alltag entweichen konnte. Meinem besten Freund Sebastian möchte ich für die jährlichen Wanderurlaube danken, die für mich jedes Jahr der Höhepunkt hinsichtlich Entspannung und Krafttanken waren.